

Université Paris Descartes

**Ecole doctorale : GC2ID**

*Laboratoire de Pathologies, Imagerie et biothérapies orofaciales, EA 2496*

Régénération de la pulpe dentaire par  
ingénierie tissulaire: mise au point d'une  
«pulpe équivalente»

Par Jean-Baptiste SOURON

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Dirigée par Madame le Dr S. VITAL, Madame le Pr C. CHAUSSAIN

Présentée et soutenue publiquement le 25 novembre 2013

Devant un jury composé de :

MANZARES Cristina, PR

Rapporteur

TASSERY Hervé, PU-PH

Rapporteur

LETOURNEUR Didier, DR

Examineur

POLIARD Anne, PR

Examineur

VITAL Sibylle, MCU-PH

Examineur

CHAUSSAIN Catherine, PU-PH

Examineur



# Table des matières

<b>INDEX DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>5</b>
<b>INDEX DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>7</b>
<b>I. LA PULPE DENTAIRE.....</b>	<b>11</b>
<b>A. Éléments cellulaires de la pulpe .....</b>	<b>13</b>
1. Les fibroblastes.....	13
2. Les odontoblastes .....	13
3. Les cellules immunitaires. ....	14
4. Les cellules souches pulpaire.....	15
<b>B. Matrice extracellulaire de la pulpe .....</b>	<b>20</b>
<b>C. Vascularisation .....</b>	<b>21</b>
<b>D. Innervation .....</b>	<b>22</b>
<b>E. Pathologies du parenchyme pulpaire.....</b>	<b>23</b>
1. Etiologie des pathologies pulpaire.....	23
2. Inflammation .....	25
<b>II. ENJEUX DE LA REGENERATION .....</b>	<b>27</b>
<b>A. Traitement par formation d'un pont dentinaire.....</b>	<b>29</b>
<b>B. Régénération partielle in situ de la pulpe .....</b>	<b>30</b>
<b>C. La synthèse de novo de la pulpe: .....</b>	<b>31</b>
<b>D. Ingénierie tissulaire .....</b>	<b>32</b>
<b>E. Régénération partielle de la pulpe .....</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>36</b>
<b>A. Matériel.....</b>	<b>37</b>
1. Cultures cellulaires.....	37
2. Préparation des matrices .....	38
3. Marquage à l'oxyne-Indium 111 .....	38
<b>B. In vivo.....</b>	<b>39</b>
1. Implantation ectopique .....	39
2. Implantation dans la dent .....	39
<b>C. Techniques d'imagerie .....</b>	<b>40</b>
1. µscanner.....	40
2. SPECT.....	40
3. Autoradiographie.....	41

<b>D. Analyse histologique .....</b>	<b>41</b>
1. Coloration à l'Hémalun-éosine.....	41
2. Coloration au Trichrome de Masson .....	42
3. Immunohistochimie.....	42
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>44</b>
<b>A. Mise au point du modèle .....</b>	<b>45</b>
1. Prélèvement et culture de cellules pulpaire de rat .....	45
2. Mise au point de la culture en 3D .....	45
<b>Implantation ectopique</b> .....	<b>47</b>
3. Mise au point du modèle d'implantation dans la molaire de rat .....	48
<b>Suivi des cellules par imagerie nucléaire.....</b>	<b>52</b>
<b>Cytotoxicité du marqueur</b> .....	<b>52</b>
4. Suivi des cellules marquées.....	53
<b>B. Fonctionnalité du tissu .....</b>	<b>57</b>
1. Analyse histologique .....	57
<b>Analyse en <math>\mu</math>CT</b> .....	<b>58</b>
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>A. Protocole .....</b>	<b>61</b>
<b>B. Suivi et devenir des cellules implantées .....</b>	<b>63</b>
<b>C. Limites du modèle .....</b>	<b>64</b>
<b>D. Transfert vers la clinique humaine .....</b>	<b>65</b>
<b>VI. CONCLUSION.....</b>	<b>67</b>
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>69</b>
<b>VIII. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS : .....</b>	<b>76</b>
<b>IX. ANNEXE I.....</b>	<b>77</b>
<b>X. ANNEXE II.....</b>	<b>86</b>

## **Index des abréviations**

BMSCs : Bone Marrow Stem Cell

CGEP : Calcitonin Gene Related Peptide

CT : Computed Tomography

d : dentine

DMEM : Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium

DPSCs : Dental Pulp Stem Cells

FvW : Facteur von Willebrandt

iDCs : Interdigitating dendritic cell

LB : Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

MAP-kinase : Mitogen-activated protein kinase

MEM : Eagle's minimal essential medium

MMP : Métallo-protéase

NFkappaB : Nuclear Factor kappa B

Od : Odontoblastes

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Agent

PGA : Polyglycolic Acid

SHED : Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous

SPECT : Single photon emission computed tomography

SVF : Sérum de veau fœtal

TLR : Toll Like Receptor

W : Zone de Weil

## Index des figures

Figure 1 : Coupe histologique de dentine et de pulpe .....	12
Figure 2 : Dentine observée au microscope électronique à balayage .....	14
Figure 3 : DPSCs en culture.....	16
Figure 4. Marquages par immuno-histochimie de protéines des BMSCs et DPSCs.....	16
Figure 5 : Immunomarquage de DPSCs. ....	17
Figure 6 : Analyse par cytométrie de flux des marqueurs cellulaires et microphotographie ..	18
Figure 7: Coupe histologique d'une dent diagnostiquée en pulpite réversible (Seltzer and Bender) .....	24
Figure 8 : Coupe histologique d'une dent diagnostiquée en pulpite irréversible (Seltzer and Bender) .....	24
Figure 9 : Coupe histologique d'une dent nécrosée (Seltzer and Bender) .....	25
Figure 10 : Cellules pulpaire de rat en culture (P0) .....	45
Figure 11 : Analyse de la prolifération cellulaire dans les matrices de collagène.....	46
Figure 12: Imagerie de SPECT / CT d'un essai de marquage de cellules pulpaire dans une matrice collagénique .....	46
Figure 13 : Imageries obtenues par Beta imager .....	47
Figure 14 : Coupe d'une matrice cellularisée implantée en sous-cutané chez le rat .....	47
Figure 15 : Coupe histologique de matrice implantée (coloration au Rouge Sirius) .....	48
Figure 16 : Schéma présentant les différents matériaux implantés .....	49
Figure 17 : Perforation du plancher pulpaire .....	49
Figure 18 : Pulpotomie sans perforation .....	50
Figure 19 : Interface matrice / silicate de calcium (coloration hémalaun-éosine) .....	50
Figure 20 : Technique d'implantation des matrices dans la première molaire maxillaire de rat après pulpotomie .....	51
Figure 21 : Image de $\mu$ CT juste après un essai d'implantation.....	51
Figure 22 : Prolifération et survie des cellules pulpaire de rat avec et sans marquage radioactif.....	52
Figure 23 : Suivi par SPECT/CT d'une matrice cellularisée implantée dans une première molaire de rat .....	53
Figure 24. Reconstructions SPECT/CT chez un animal implanté avec des cellules entières (flèche rouge) et des cellules lysées (flèche bleue).....	54
Figure 25. Quantification du signal des matrices implantées avec des cellules lysées et des cellules entières. ....	55
Figure 26 : Imagerie par SPECT/CT d'une tête de rat après implantation dans les premières molaires maxillaires. Aucun signal radioactif n'est retrouvé en dehors de la zone d'implantation. ....	55
Figure 27. Reconstruction SCPET/CT d'une acquisition de corps entier. ....	56
Figure 28 : Imagerie par micro-CT et coupes histologiques de matrices implantées .....	57
Figure 29 : Immunohistochimie des matrices implantées .....	58
Figure 30 : Imagerie par micro CT des matrices implantées .....	59

## **Contexte scientifique**

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire **Pathologies, Imagerie et Biothérapies Orofaciales** dirigé par le Professeur Catherine Chaussain. J'ai eu l'opportunité d'y faire un premier stage en master 1, puis de pouvoir y poursuivre mon parcours de recherche en master 2. Mon sujet de recherche s'inscrivait alors dans une des thématiques historiques du laboratoire, la compréhension des mécanismes régissant la minéralisation dentinaire. J'ai pour ma part, travaillé sur le rôle de la protéine prion dans l'odontogenèse, *via* l'étude d'un modèle de souris invalidée pour cette protéine. Ce travail a permis, outre une acquisition des bases scientifiques et techniques indispensables pour mon doctorat, la publication d'un article international en collaboration avec une équipe américaine de UCSF (Annexe I).

A l'issue de mon master 2, j'ai souhaité poursuivre mon cheminement scientifique et j'ai profité de développement d'une nouvelle thématique au laboratoire : le développement d'une thérapie cellulaire pour la régénération pulpaire. Ce projet global est basé sur l'utilisation des cellules souches de la pulpe dentaire pour la mise au point d'une thérapie innovante dans le traitement des pulpes inflammatoires. Nous souhaitons mettre au point une « pulpe équivalente » (cellules souches mésenchymateuses issues de la pulpe dentaire ensemencées dans une matrice), implantable dans la chambre pulpaire évidée suite à l'exérèse du parenchyme pulpaire caméral, permettant la régénération d'un tissu conjonctif fonctionnel, vascularisé et innervé.

Dans ce but, nous nous sommes placés dans une optique préclinique et avons travaillé à partir de cellules pulpaire de rat. En parallèle, d'autres membres du laboratoire travaillaient sur des approches plus fondamentales portant sur les propriétés des cellules souches de la pulpe afin de les caractériser et de rechercher leur capacité à survivre en conditions hypoxiques et à induire une angiogenèse. Concernant mon projet, nous avons développé une culture tridimensionnelle de ces cellules pulpaire dans un lattis de collagène, afin de constituer une « pulpe équivalente ». L'innocuité de ces matrices ensemencées de cellules pulpaire a été testée par des implantations ectopiques chez le rat. Puis, dans une perspective préclinique, nous avons implanté ces pulpes équivalentes dans un modèle de pulpotomie chez le rat.

Dans ce contexte d'ingénierie tissulaire à partir de cellules souches, nous nous sommes penchés sur la question cruciale du devenir des cellules implantées dans un organisme. Pour ce faire, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe U698-IFR2 du Docteur



Letourneur, et notamment avec le Docteur Rouzet et Madame Petiet, afin d'effectuer le suivi des cellules implantées par imagerie. Nous avons opté pour un marquage radioactif des cellules implantées et un suivi par imagerie nucléaire, permettant une évaluation très précise de la migration éventuelle et du devenir des cellules implantées.

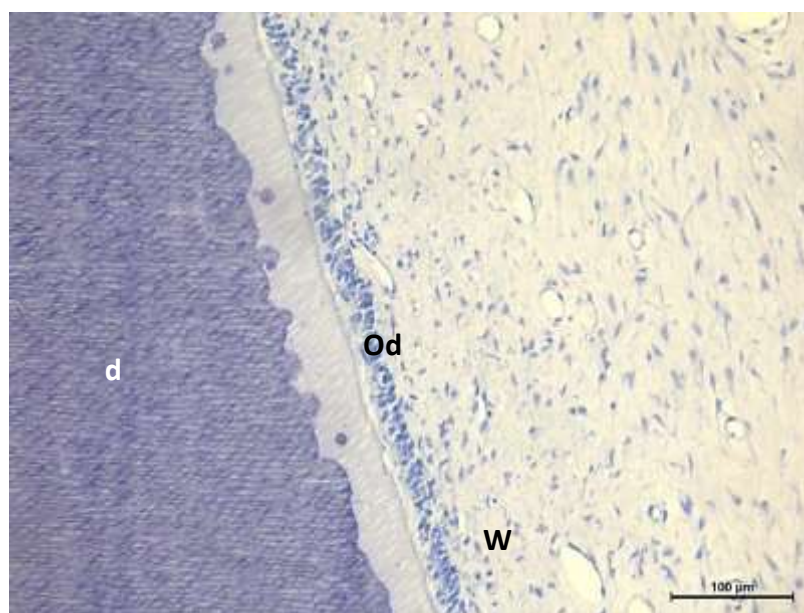
Ce travail a donné lieu à une publication internationale (Annexe II).



## **I. La pulpe dentaire**

Dans la perspective de la mise au point d'une « pulpe équivalente », il est nécessaire de connaître les éléments natifs constitutifs de ce tissu conjonctif hétérogène. Classiquement, sur les coupes histologiques, le tissu pulpaire peut être divisé en 4 zones (Mjor, Sveen et al. 2001):

- La zone odontoblastique (Od) à la périphérie, au contact de la dentine (d)
- Une zone acellulaire (zone de Weil, W) juste en-dessous des odontoblastes
- Une zone riche en cellules
- La zone plus centrale caractérisée par la présence de vaisseaux et de nerfs



**Figure 1 : Coupe histologique de dentine et de pulpe**

**Coloration au bleu de Toluidine (document EA2496).**

La pulpe contient différents types cellulaires, des cellules dérivées des crêtes neurales, des cellules migratrices provenant du mésenchyme para-axial et des cellules mésenchymateuses déjà présentes dans le premier arc branchial. Par ailleurs, ce tissu contient également des vaisseaux sanguins et des éléments nerveux (Piette 2001; Goldberg 2011). La présence de l'ensemble de ces populations cellulaires confère à la pulpe, ses fonctions de nutrition, sensibles et de réparation. Les différentes populations cellulaires pulpaire jouent un rôle primordial dans la réponse aux agressions.

## ***A. Éléments cellulaires de la pulpe***

### **1. Les fibroblastes**

La zone centrale du parenchyme pulpaire contient principalement des fibroblastes d'aspect fusiforme ou épineux et dont la principale fonction est l'élaboration et le renouvellement de la matrice extracellulaire (MEC). Ce renouvellement est assuré par la synthèse de fibres de collagène de type I et III, de protéoglycanes et de glycoprotéines.

Les fibroblastes peuvent synthétiser des cytokines en réponse à divers stimuli. Après agression, ils sont aussi impliqués dans la cicatrisation des lésions pulpaires, avec par exemple la sécrétion de facteurs angiogéniques (Mathieu, El-Battari et al. 2005).

Les fibroblastes, en particulier de la pulpe jeune, ont des activités de synthèse et de sécrétion importantes et possèdent un réticulum endoplasmique granulaire et un appareil de Golgi développés. La plupart des fibroblastes sont interconnectés par des desmosomes et des jonctions communicantes (Piette 2001; Goldberg, Smith 2004).

### **2. Les odontoblastes**

Les cellules odontoblastiques apparaissent allongées (corps de 50 à 60  $\mu\text{m}$ ) avec un noyau basal. Elles contiennent de nombreuses organelles associées à de multiples vésicules, un réticulum endoplasmique très développé et un appareil de Golgi important, situé entre le noyau et le front dentinaire. Elles établissent des complexes de jonction entre elles assurant une cohésion mécanique entre les odontoblastes et créant ainsi une véritable barrière histologique. Ces cellules possèdent un prolongement cytoplasmique (ou « fibre de Tomes ») occupant un tubuli dentinaire (Figure 2) et participant activement à la minéralisation dentinaire. En effet, ce prolongement contient des mitochondries, des éléments du cytosquelette (microtubules et filaments intermédiaires), et des vésicules de sécrétion permettant la synthèse de la dentine (Goldberg, Smith 2004).

Les odontoblastes sont disposés en palissade au contact de la dentine (Ruch, Lesot et al. 1995). Ils participent à la proprioception et la nociception (Magloire, Couble et al. 2009; Magloire, Maurin et al. 2010; Maurin, Couble et al. 2013). Ils secrètent les dentines primaire puis secondaire et tertiaire (Magloire, Couble et al. 2004).

La dentine primaire est synthétisée avant la mise en place de la dent sur l'arcade et la dentine secondaire après l'éruption de la dent. Quant à la dentine tertiaire, elle est sécrétée en réponse aux agressions, notamment lors des processus carieux (Smith, Cassidy et al. 1995; Farges, Keller et al. 2009).

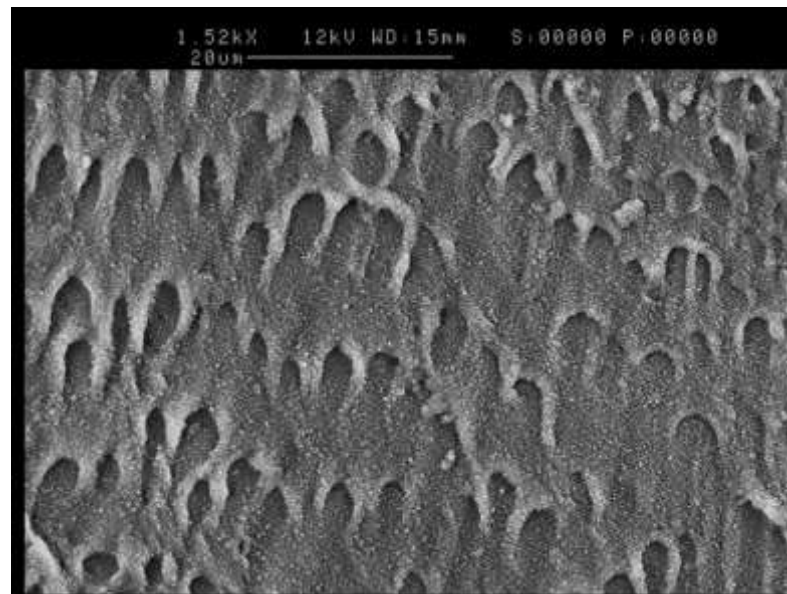


Figure 2 : Dentine observée au microscope électronique à balayage

Les tubuli dentinaires dans lesquels se logent les prolongements odontoblastiques sont observables (document EA2496).

### 3. Les cellules immunitaires.

Plusieurs types de cellules immunitaires sont présents dans la pulpe. La pulpe saine, non enflammée, ne contient que des cellules dendritiques (iDc myéloïdes), des macrophages et des lymphocytes T (Jontell, Okiji et al. 1998). Les iDCs et les macrophages constituent environ 8% de la population totale des cellules pulpaire avec un ratio iDCs/macrophages de 4 pour 1. Deux populations distinctes de cellules dendritiques ont été identifiées dans la pulpe saine : les cellules dendritiques CD11c+, présentes principalement à la jonction dentine-pulpe, et les cellules dendritiques F4/80+, concentrées autour des vaisseaux sanguins du centre de la pulpe ainsi que dans la région sous-odontoblastique à partir de laquelle elles étendent de fins prolongements entre les odontoblastes, parfois jusqu'à la dentine (Farges, Romeas et al. 2003). La fonction principale des iDCs est de présenter les antigènes qu'elles ont capturés aux lymphocytes T naïfs pour les activer. Cette présentation

a lieu après maturation des iDCs dans les zones T des ganglions lymphocytes régionaux (Zhang, Kawashima et al. 2006).

Les macrophages pulpaire apparaissent comme de grandes cellules ovalaires principalement localisées dans les zones périvasculaires. En l'absence de pathologie, ils sont impliqués principalement dans la phagocytose et l'élimination des cellules mortes.

Les lymphocytes T (LTs) sont rares dans la pulpe dentaire et les lymphocytes B (LBs) y sont exceptionnellement rencontrés. (Farges, Romeas et al. 2003).

#### **4. Les cellules souches pulpaire**

##### **a) Origine**

La présence de cellules souches dans la pulpe a été mise en évidence dès 2000 par l'équipe de Gronthos, au sein de pulpe de dents permanentes ; elles ont été nommées DPSCs pour **Dental Pulp Stem Cells** (Gronthos, Mankani et al. 2000). L'intérêt principal de la découverte de cette nouvelle niche de cellules multipotentes dans la dent réside à la fois dans la facilité d'accès à ces cellules et dans la possibilité de les conserver en vue d'une utilisation future. Quelques années plus tard, la même équipe a montré que des cellules souches pulpaire étaient aussi présentes dans la pulpe des dents temporaires. Ces cellules sont alors nommées SHED, pour **Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth**, ouvrant ainsi la voie à une source de cellules souches unique et « naturelle » du fait de l'exfoliation physiologique des dents temporaires. (Batouli, Miura et al. 2003; Kerkis, Caplan 2012)

##### **b) Caractéristiques phénotypiques**

Les cellules souches pulpaire ont un phénotype proche des cellules souches issues de la moelle osseuse, les BMSCs (Bone Marrow Stem Cells). En culture, ce sont de grandes cellules, fusiformes, avec un grand noyau central, un cytoplasme volumineux (Figure 3).

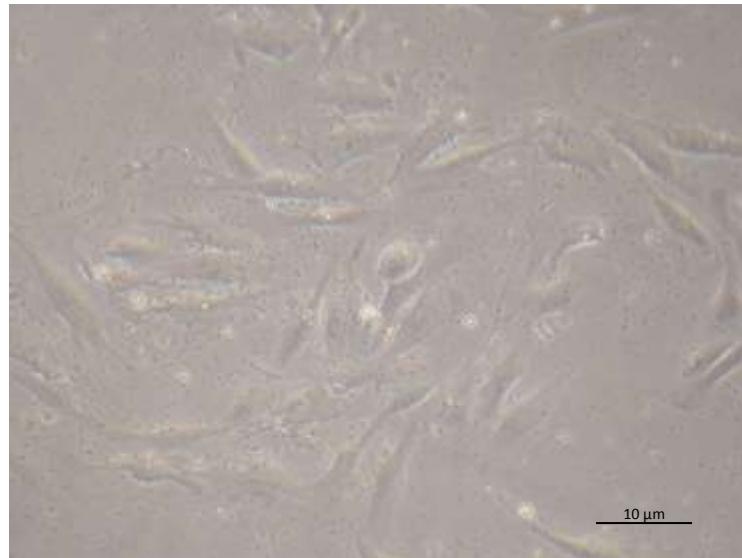


Figure 3 : DPSCs en culture

Les cellules souches pulpaire adoptent un phénotype présentant de nombreuses similarités avec les BMSCs.

Table 1. Immunohistochemical analysis of human DPSCs and BMSCs *in vitro*

Marker	DPSC-1	DPSC-2	BMSC
CD14	-	-	-
CD34	-	-	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
Integrin $\beta 1$	++/+	++/+	++
VCAM-1	+	+	++
MyoD	-	-	-
$\alpha$ -SM actin	++/-	++/-	++/+/-
Neurofilam.	-	-	-
MUC-18	++/-	++/+/-	++/-/-
Collagen-I	+	++	++/+
Collagen-II	-	-	-
Collagen-III	++/+	++/+	++/+
Osteocalcin	++/+	++/+	+/-
Osteonectin	++/+	++	++/+
BSP	-	-	+/-
Osteopontin	+/-	+/-	+/-
Alk Phos	++/+/-	++/+/-	++/+/-
PPAR $\gamma$	-	-	-
FGF-2	++/+	++	++/+

++, strong staining; +, weak staining; -, negative; -, subpopulation; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; MyoD, myocyte origin;  $\alpha$ -SM actin, alpha-smooth muscle actin; MUC-18, CD146; BSP, bone sialoprotein; Alk Phos, alkaline phosphatase; PPAR $\gamma$ , peroxisomal proliferator activated receptor gamma 2; FGF-2, fibroblast growth factor 2.

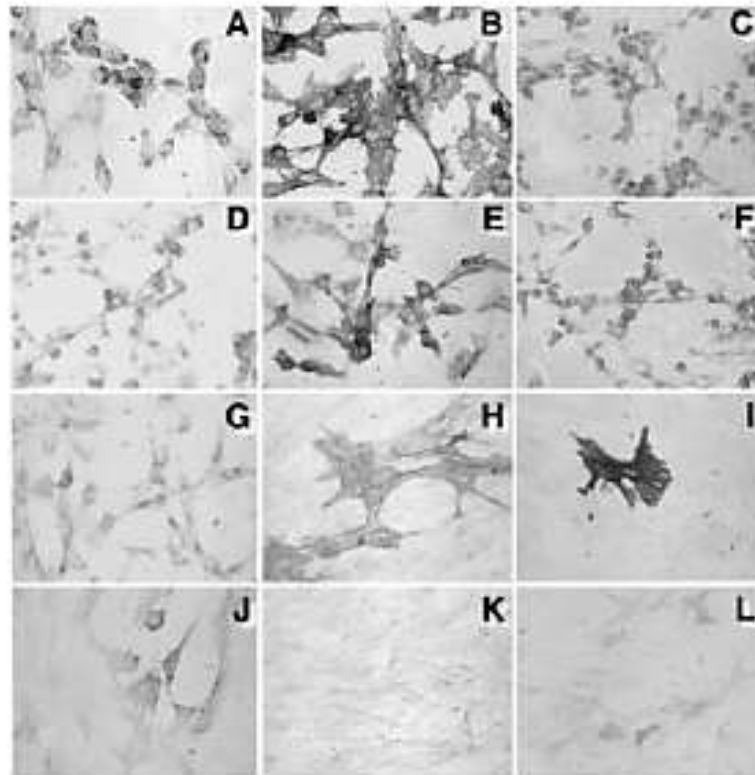
Figure 4. Marquages par immuno-histochimie de protéines des BMSCs et DPSCs

Le marquage par immuno-histochimie montre la présence des marqueurs des cellules souches et de nombreuses similarités avec les BMSCs. D'après (Gronthos, Mankani et al. 2000)

Au niveau immuno-histologique, les cellules souches pulpaire sont très proches des cellules souches de moelle osseuse (Gronthos, Mankani et al. 2000). Les marqueurs de surface



communs sont retrouvés (Figures 4 et 5). *In vitro*, ces DPSCs sont capables de se différencier dans de nombreux types cellulaires, comme les BMSCs.



**Fig. 2.** Immunophenotype of cultured DPSCs. Studies based on immunoperoxidase reactivity were performed on first passage cultures of DPSCs. Representative staining patterns are shown for: integrin  $\beta 1$  (A); CD44 (B); collagen type I (C); collagen type III (D); fibroblast growth factor-2 (E); osteonectin (F); osteocalcin (G); MUC-18 (CD146) (H);  $\alpha$ -smooth muscle actin (I); osteopontin (J); and vascular cell adhesion molecule 1 (K). Endogenous alkaline phosphatase activity is shown in L.

Figure 5 : Immunomarquage de DPSCs.

Répartition des différentes protéines mise en évidence par immunohistchimie sur des DPSCs en culture. D'après (Gronthos, Mankani et al. 2000)

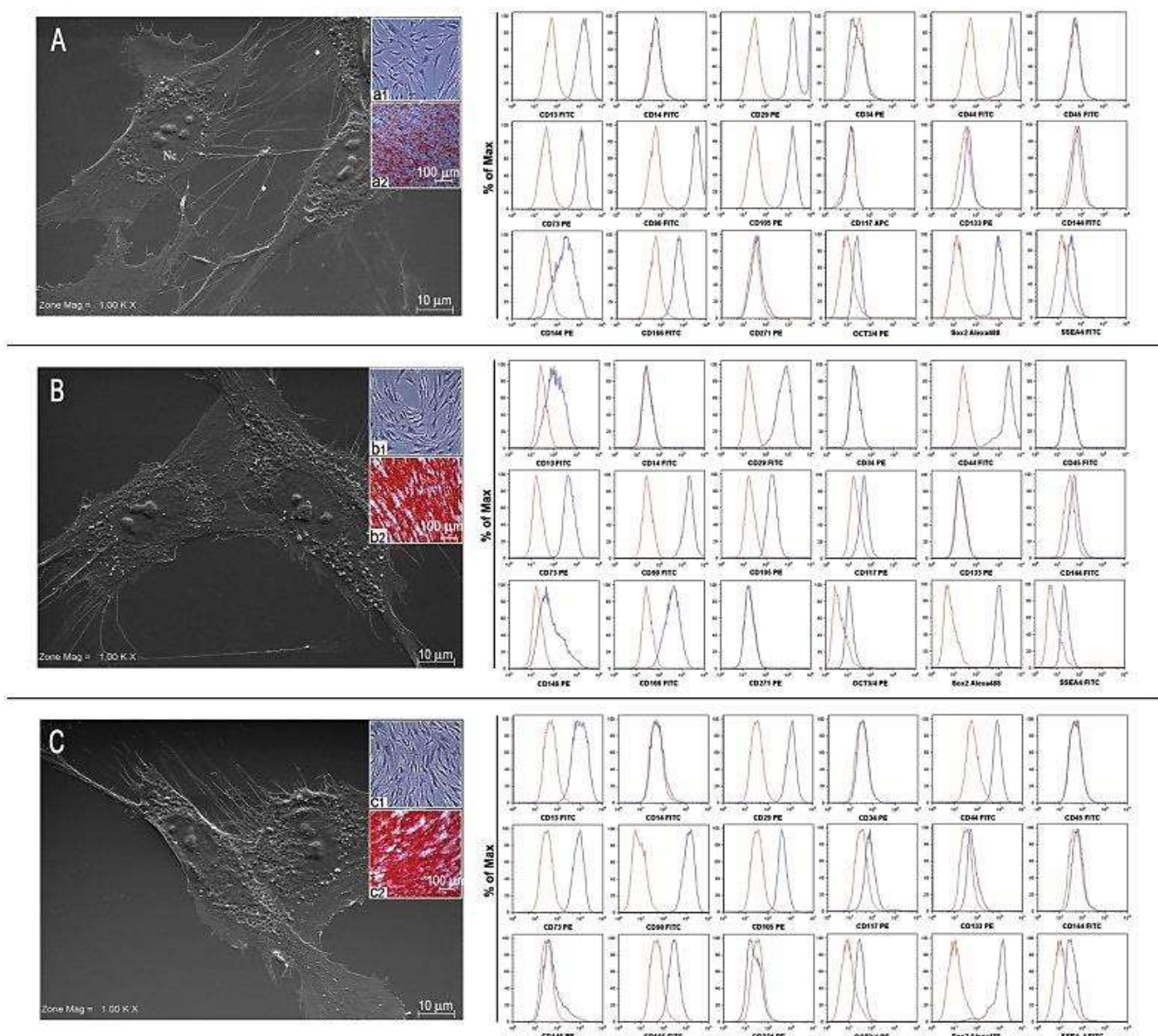


Figure 6 : Analyse par cytométrie de flux des marqueurs cellulaires et microphotographie

D'après (Eleuterio, Trubiani et al. 2013)

Phénotypiquement les DPSCs présentent des caractéristiques similaires aux BMSCs (figure 6). Les marqueurs de surface et la répartition des protéines sont également retrouvés de façon comparable (Figure 6)(Gronthos, Mankani et al. 2000; Gronthos, Brahim et al. 2002; Eleuterio, Trubiani et al. 2013).

Les DPSCs présenteraient en outre un taux de prolifération plus important que les BMSCs, sans perte de leur multipotence (Gronthos, Mankani et al. 2000; Seong, Kim et al. 2010).

### **c) Isolation**

Les techniques d'isolation qui ont été utilisées pour les cellules souches pulpaire sont celles qui ont été développées pour les BMSCs (Tirino, Paino et al. 2012). En raison du taux important de prolifération des DPSCs, l'isolation à partir de cette propriété a été proposée par (Gronthos, Mankani et al. 2000). Il s'agit d'individualiser les cellules, de les ensemercer et de sélectionner les clones ayant le taux de prolifération le plus important. Ce taux de renouvellement important est maintenu au-delà de 25 passages (Rodriguez-Lozano, Insausti et al. 2012).

Différents marqueurs sont proposés pour caractériser les cellules souches pulpaire humaines (Kawashima 2012), pour la plupart communs aux BMSCs, à savoir OCT3/4, CD90, STRO1 ... Les marqueurs de surface caractéristiques des cellules souches peuvent alors être utilisés pour sélectionner les cellules par tri au FACS ou grâce des anticorps fixés à des billes (Kawashima 2012). Cependant, il n'existe pas de marqueurs spécifiques aux DPSCs.

### **d) Différenciation**

*In vitro*, les DPSCs sont capables de se différencier dans tous les types de lignées germinales (Kawashima 2012):

De nombreux protocoles permettent la différenciation des DPSCs vers les cellules neurales (Kim, Bae et al. 2012; Fang, Yang et al. 2013). La différenciation en neurones a pu être obtenue (Arthur, Rychkov et al. 2008).

Les DPSCs peuvent se différencier en cellules issues de la lignée mésodermique : myocytes, ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et cardiomyocytes (Jo, Lee et al. 2007; Koyama, Okubo et al. 2009; Gronthos, Arthur et al. 2011; I, Nargi et al. 2011)

La lignée endodermique (cellules hépatiques) est aussi obtenue par différenciation des DPSCs (Iohara, Zheng et al. 2006; Rodriguez-Lozano, Insausti et al. 2012)

*In vivo*, ces capacités de différenciation ont été utilisées lors de la mise en place de cellules neurales différenciées à partir de DPSCs au niveau de lésions du cerveau chez le rat (Kiraly, Kadar et al. 2011). Plus spécifiquement, les DPSCs ont montré leur capacité à se différencier dans de nombreux types de cellules pulpaire. Un point important est leur capacité à se différencier en cellules odontoblastiques synthétisant de la dentine (Yu, Deng et al. 2006; Onyekwelu, Seppala et al. 2007)

## B. Matrice extracellulaire de la pulpe

A côté des éléments cellulaires, la pulpe est constituée d'une MEC, essentiellement composée de collagènes (34%), au premier rang desquels le collagène de type I et de type III. Les collagènes de type V, VII et IV sont également retrouvés dans un plus faible pourcentage (Goldberg 2008).

Les glycosaminoglycanes constituent, quant à eux, 50 % des molécules matricielles pulpaires et ont pour rôle principal d'assurer la rétention d'eau (Bogovic, Nizetic et al. 2011). Les différents types retrouvés sont :

- Chondroïtines sulfates 4 et 6
- Dermatan sulfate
- Kératane sulfate
- Héparane sulfate
- Acide hyaluronique ou hyaluronane

Composants matriciels de la pulpe		
Collagènes (34 % de la totalité)	Type I : 56 % Type III : 41 % Type V : 1-3 % Type IV Type VI et fibrilline	
Protéines non collagéniques (66 % de la totalité)	Glycosaminoglycanes libres Grands protéoglycanes Petits protéoglycanes riches en leucine (SLRP) Fibronectine (FN) Élastine MMP/TIMP	CS/DS, KS, HS GAG Versican Décorine, biglycan Fibromoduline FN sérique et cellulaire Accompagne la vascularisation MMP-1, -2, -9, -13, -20 MT1-MMP TIMP 1-3
Protéines de l'inflammation	Interleukine-1 Prostaglandines Polypeptide de type vasoactif intestinal	
Facteurs de croissance et leurs récepteurs	TGFβ1, BMP-2, BMP-4, BMP-6 BMPR-I BMPR-II	ALK-1, ALK-2, BMPR-1A, ALK-4, ALK-5, ALK-6 ou BMPRII Récepteur de BMP de type II
Lipides cellulaires et matriciels		Phospholipides membranaires et matriciels
Molécules absentes ou présentes à l'état de traces	Pas d'OC, DPP, DSP, DMP-1, BSP Traces de sialoprotéine	

Tableau 1 : Composants matriciels de la pulpe

D'après (Goldberg 2008)

Les glycoprotéines principalement représentées par les fibronectine, ténascine et thrombospondine, jouent un rôle dans la liaison des fibroblastes au réseau fibrillaire collagénique. La fibronectine aurait un rôle dans le maintien de la morphologie spécifique des odontoblastes, dans leur différenciation terminale et dans les interactions entre cellules (Bender, Seltzer et al. 2003).

L'élastine est présente au niveau des vaisseaux sanguins et assure l'élasticité des parois (Piette 2001).

Les métallo-protéases matricielles jouent un rôle de dégradation des protéines extracellulaires. Elles participent donc aux processus de remodelage de la pulpe normale et aux phénomènes inflammatoires et cicatriciels (Bogovic, Nizetic et al. 2011)

Cette composition de la MEC permet le maintien de l'hydratation par stockage des molécules d'eau. Elle autorise le transit des métabolites, des nutriments, des débris cellulaires, entre les vaisseaux et les cellules pulpaires (Goldberg, Six et al. 2009)

### ***C. Vascularisation***

La pulpe dentaire est un tissu richement vascularisé. Les vaisseaux sanguins pénètrent dans la pulpe par les foramens apicaux et secondaires. Ils progressent au centre du canal radiculaire en direction de la chambre pulpaire où ils se ramifient progressivement pour former en périphérie un fin réseau de capillaires sous-odontoblastiques de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. D'autres vaisseaux, de taille inférieure, peuvent pénétrer dans la pulpe par les canaux accessoires (Trubiani, Tripodi et al. 2003). Au niveau de la couronne, les artérioles principales se ramifient en artérioles secondaires qui se ramifient à leur tour pour former à la périphérie de la chambre pulpaire un vaste réseau de capillaires vasculaires (5-10 $\mu\text{m}$ ). Ces capillaires sont fenestrés à proximité des odontoblastes ce qui permet une meilleure diffusion des nutriments. Les vaisseaux sanguins pénètrent dans la pulpe et en sortent par les foramen apical et secondaire sous la forme d'une ou parfois deux artérioles (35-45 $\mu\text{m}$ ) passant au centre du canal de la racine.

Le retour veineux se fait également par le foramen apical. Il est assuré par des veinules post-capillaires qui se regroupent pour former des veinules collectrices dans la partie centrale du canal radiculaire.

L'existence d'anastomoses artérioveineuses, points de communication directe entre les côtés veineux et artériels de la circulation contribuent à la régulation du débit sanguin et de la pression intrapulpaire et permettent de dériver le flux sanguin et d'isoler une anse en cas de lésion.

La présence d'un réseau lymphatique pulpaire est aujourd'hui débattue. Selon certains (Marchetti, Poggi et al. 1992; Sawa, Yoshida et al. 1998), ce réseau prendrait naissance dans la région sous-odontoblastique. Les vaisseaux lymphatiques conflueraient vers la partie

centrale et sortiraient de la pulpe par le foramen apical. Le drainage lymphatique s'effectuerait vers les ganglions sous-mentonniers et sous-mandibulaires, puis vers les ganglions cervicaux. D'autres auteurs semblent montrer l'absence de réseau lymphatique au sein du parenchyme pulpaire (Gerli, Secciani et al. 2010; Martin, Gasse et al. 2010).

#### ***D. Innervation***

Le réseau nerveux pulpaire est essentiellement constitué de fibres sensibles issues du nerf trijumeau dont les corps cellulaires se trouvent dans le ganglion de Gasser. Les fibres pénètrent dans la pulpe par le foramen apical et les canaux accessoires et se regroupent au centre du canal radiculaire pour former de volumineux faisceaux qui se ramifient dans la chambre pulpaire où ils se terminent sous la forme d'un réseau dense de fibres nerveuses appelé plexus pulpaire sous-odontoblastique (ou plexus de Rashkow) (Bletsa, Fristad et al. 2009; Magloire, Couble et al. 2009). Si la plupart des fibres nerveuses sensibles se terminent dans ce plexus, certaines se prolongent jusqu'au pôle apical de l'odontoblaste et pénètrent dans la prédentine, puis dans la dentine sur une distance d'environ 200 microns (Maeda, Iwanaga et al. 1987). Les fibres nerveuses pulpaires sont pour la plupart des fibres amyéliniques de type C qui représentent 70 à 90 % des fibres nerveuses des dents définitives et temporaires. Ce sont des fibres chimio et thermosensibles, activées essentiellement au cours de l'inflammation pulpaire, transmettant la douleur. Elles libèrent également un certain nombre de neuromédiateurs, en particulier la substance P. La pulpe contient également des fibres A- $\delta$  impliquées elles aussi dans la transmission douloureuse. Elles seraient stimulées par le déplacement du fluide intratubulaire. Des fibres myéliniques A- $\beta$  ont été mises en évidence dans la pulpe. Elles pourraient être impliquées dans la transmission de sensations non douloureuses engendrées par des stimulations dentaires de très faible intensité, de type vibratoire (Piette 2001). Ces fibres sont donc responsables de la sensibilité pulpo-dentinaire observée en réponse à des stimuli mécaniques, thermiques chimiques ou électriques.

Des fibres sympathiques originaires du ganglion cervical supérieur sont également présentes dans la pulpe mais en quantité moins importante. Ce sont principalement des fibres noradrénergiques qui régulent la circulation pulpaire grâce à leurs effets vasoconstricteurs.

## ***E. Pathologies du parenchyme pulpaire.***

### **1. Etiologie des pathologies pulpaires**

Les pathologies endodontiques trouvent leur origine dans trois types d'agression :

- bactériennes
- physiques
- chimiques

Les bactéries constituent la cause majeure de pulpite. Les toxines bactériennes et les bactéries peuvent entrer en contact avec le parenchyme pulpaire *via* les tubuli dentinaires lors d'une lésion carieuse ou d'une exposition pulpaire. L'échauffement par les instruments, lors du curetage d'une lésion carieuse ou la préparation d'une dent vivante, peut également être à l'origine d'une inflammation pulpaire. La section des prolongements odontoblastiques par l'instrumentation rotative peut provoquer le relargage de cytokines pro-inflammatoires par les odontoblastes.

Un nombre important de classifications concernant les pathologies pulpaires et périapicales existe : histologiques, radiographiques, cliniques.

La classification clinique apparaît comme la plus adaptée car elle est directement orientée vers l'indication ou la contre-indication du traitement. Le diagnostic de l'état pathologique pulpaire ou périapical, s'il constitue une étape essentielle, reste difficile à poser. En effet, il est basé sur l'analyse des informations obtenues par l'entretien avec le patient et les résultats des tests cliniques effectués. Il n'y a donc pas toujours de correspondance entre ce diagnostic et l'état inflammatoire du parenchyme pulpaire (Fadavi, Anderson 1996).

#### **a) *Pulpite réversible***

Cliniquement, la dent est le plus souvent asymptomatique. Dans les cas les plus avancés, des douleurs sont observées au contact d'un agent irritant (froid, sucre, acide). Elles sont caractérisées par leur brièveté et leur faible amplitude. Le plus souvent ces sensations douloureuses sont associées au froid. Le processus inflammatoire est réversible, si l'agent causal est éliminé et une étanchéité par restauration est obtenue.



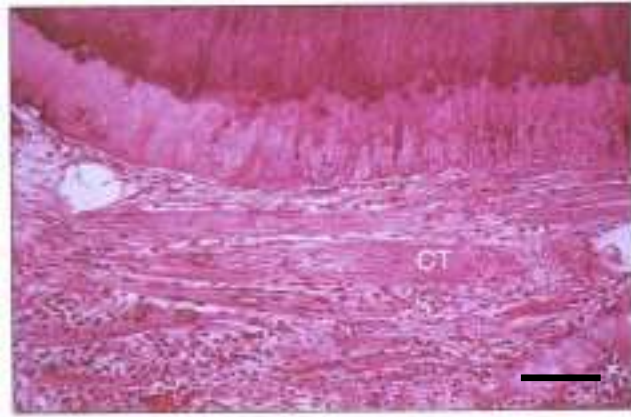


Figure 7: Coupe histologique d'une dent diagnostiquée en pulpite réversible (Seltzer and Bender)

Au niveau histologique, la pulpite réversible est caractérisée par un infiltrat inflammatoire faible, une vasodilatation à proximité de la zone lésée, comme le montre la figure 7.

## b) Pulpite irréversible

Les douleurs associées à ce degré d'inflammation de la pulpe sont généralement spontanées. Elles sont aussi caractérisées par leur rémanence, leur intensité élevée et leur irradiation. Ces douleurs sont la plupart du temps récalcitrantes à tout traitement médicamenteux. Dans les stades les plus avancés, une desmodontite est associée, rendant la dent douloureuse à la percussion.

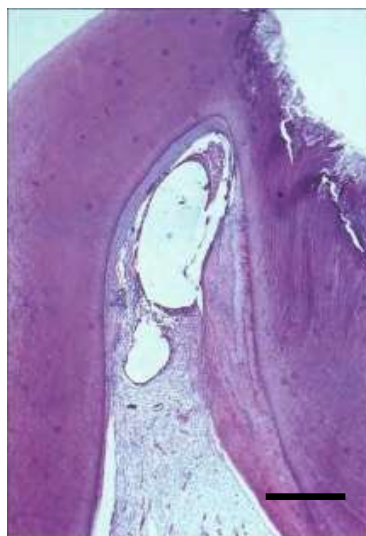


Figure 8 : Coupe histologique d'une dent diagnostiquée en pulpite irréversible (Seltzer and Bender)

La pulpite irréversible est caractérisée histologiquement par un infiltrat inflammatoire important, des zones limitées de nécrose et une vasodilatation étendue au parenchyme pulpaire (figure 8).



### c) Nécrose pulpaire

En l'absence de traitement, l'évolution de la pulpite conduit à la nécrose du parenchyme pulpaire. Ce stade est caractérisé par une absence de symptôme et de réponse aux différents tests de vitalité. Il peut ou non être associé à la présence de lésions des tissus périapicaux en raison de la présence de débris nécrotiques et de bactéries dans le système canalaire.

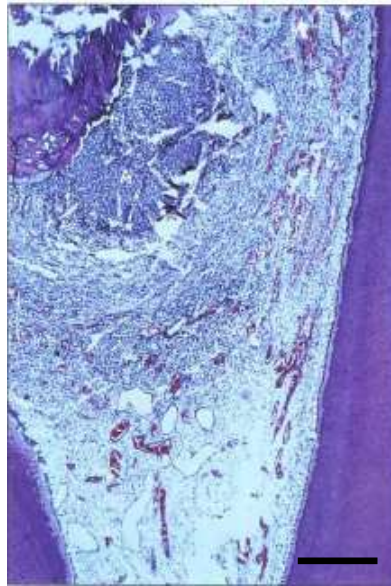


Figure 9 : Coupe histologique d'une dent nécrosée (Seltzer and Bender)

La nécrose pulpaire est caractérisée histologiquement par de larges zones de nécrose tissulaire, un envahissement bactérien et la présence de cellules de défense lysées (Figure 9).

## 2. Inflammation

Les odontoblastes, localisés à la périphérie de la pulpe sont les premières cellules à rencontrer les bactéries et leurs produits. Les odontoblastes sont des cellules immunocompétentes capables de déclencher une réponse inflammatoire (Veerayutthwilai, Byers et al. 2007). Lorsque la progression bactérienne parvient au-delà de la barrière odontoblastique, les interactions bactéries-cellules augmentent et exacerbent les réactions inflammatoires.

Les récepteurs TLRs (Toll like receptors) présents sur les membranes cellulaires et des endosomes, détectent les composants bactériens et déclenchent la réaction inflammatoire par l'activation de facteur nucléaire kappaB (Pevsner-Fischer, Morad et al. 2007).

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules activées et le relargage par la déminéralisation dentinaire crée un gradient chimotactique, recrutant et activant les cellules du système immunitaire (Reing, Zhang et al. 2009; Kokkas, Goulas et al. 2011)

Les cellules de défense infiltrant la pulpe, les lymphocytes B et T, les plaquettes, les neutrophiles et les macrophages augmentent en nombre au fur et à mesure que la lésion progresse. Paradoxalement, l'arrivée de ces cellules provoque des dommages au tissu car les cellules relarguent des enzymes protéolytiques digérant la MEC pour atteindre la zone lésée. De plus, ces cellules libèrent des radicaux libres, des enzymes notamment des MMPs aux effets délétères sur les protéines, l'ADN et les lipides. L'exposition des cellules à ces molécules peut induire nécrose ou apoptose par activation de la voie des MAP-kinase ou la voie du NFkappa B (Fiers, Beyaert et al. 1999; Simon, Berdal et al. 2011). Les activateurs de ces voies de signalisation, le stress cellulaire, l'exposition du LPS bactérien et les chocs thermiques, participent à l'inflammation pulpaire (Guha, Mackman 2001).

Les rôles des réseaux capillaires et nerveux sont à prendre en compte lors de l'inflammation pulpaire. La vasodilatation lors de la réponse inflammatoire permet l'apport de cellules immunitaires et de progéniteurs périvasculaires (Sloan, Smith 2007; Toda, Ayajiki et al. 2012)

L'innervation dentaire participe aussi à la réponse inflammatoire. Lors d'une inflammation neurogénique, les nerfs afférents réagissent aux antigènes bactériens par le relargage de neuropeptides qui recrutent et activent le système immunitaire (Caviedes-Bucheli, Munoz et al. 2008; Cooper, Takahashi et al. 2010; Manuja, Nagpal et al. 2010). Plusieurs neuropeptides ont une action reconnue dans ces mécanismes inflammatoires : les Calcitonin Gene Related Peptide (GRP), Calcitonine (CT), Substance P (SP) sont retrouvées dans les pulpes inflammatoires.

Si le processus inflammatoire pulpaire est relativement bien connu au niveau histologique, les tests cliniques ne permettent pas de connaître le degré d'inflammation du tissu pulpaire. La mise au point de moyens diagnostiques complémentaires aux « tests de vitalité » constituerait une étape intéressante pour la mise en place de traitement de régénération pulpaire.

## **II. Enjeux de la régénération**

L'infection de la pulpe dentaire causée par la carie ou par un traumatisme, nécessite souvent un traitement endodontique. Ce traitement a pour but d'éliminer l'ensemble du parenchyme pulpaire vascularisé et innervé, les bactéries et leurs toxines. Le nettoyage par des agents chimiques est associé à une mise en forme mécanique du réseau canalaire afin d'obtenir la désinfection du réseau canalaire. Le maintien dans le temps de cette désinfection est recherché par une obturation étanche et complète du réseau canalaire par un matériau inerte.(Huang 2008; Huang 2009).

Malgré un succès clinique rapporté, les études évaluant les traitements endodontiques montrent des taux d'échec très importants, avec environ 70% de traitements insatisfaisants par manque d'étanchéité, contamination bactérienne ou persistance des pathologies infectieuses ou inflammatoires de la pulpe. En effet, la complexité de l'anatomie radiculaire crée des zones non instrumentables, peu accessibles aux solutions de désinfection (Robinson, Lumley et al. 2012) et aux produits d'obturation canalaire. Une dent traitée endodontiquement a 5 à 10 fois plus de risques de présenter une lésion apicale (Buckley, Spangberg 1995; Friedman, Abitbol et al. 2003) induisant un essaimage bactérien pouvant conduire à une greffe bactérienne sur un organe vital (cœur, rein, articulation...). De plus, du fait de l'absence d'apport sanguin et de la disparition de la proprioception, les propriétés de résistance de la dentine aux pressions axiales diminuent, conduisant à l'apparition de fissures, puis de fractures qui peuvent condamner la dent à l'extraction. En outre, la perte de vitalité pulpaire des dents permanentes immatures implique l'arrêt de la formation de la dentine et la maturation de la dent.

Ainsi, les recherches actuelles en endodontie travaillent à la mise au point de méthodes alternatives, efficaces, fiables et sûres (Nakashima, Akamine 2005; Murray, Garcia-Godoy et al. 2007). Il existe notamment une volonté de créer des alternatives biologiques au traitement endodontique, avec le développement de « l'endodontie régénératrice », visant à l'élimination des tissus pulpaire infectés ou nécrosés et leur remplacement par un tissu pulpaire régénéré pour revitaliser les dents.

De nombreux scientifiques et dentistes travaillent ensemble à la réalisation de ce projet ambitieux (Tziafas 2004; Nakashima, Akamine 2005; Huang 2009; Sun, Jin et al. 2011; Rai, Kaur et al. 2012; Iohara, Murakami et al. 2013; Masthan, Sankari et al. 2013), dont le but ultime de ce traitement régénérateur vise à reconstituer le continuum de tissu à la frontière

pulpe-dentine en régulant les procédés spécifiques de dentinogenèse tertiaire (Tziafas 2004).

Bien que le potentiel de régénération de la pulpe dentaire ait été considéré pendant longtemps comme extrêmement limité, en particulier dans les dents matures, les avancées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et les connaissances de la biologie des cellules souches favorisent aujourd'hui l'émergence de la diversité des approches pour la régénération d'une pulpe fonctionnelle.

### ***A. Traitement par formation d'un pont dentinaire***

Comme évoqué plus haut, il est désormais démontré qu'une population de cellules progénitrices se trouve au sein de la pulpe dentaire, qu'elles peuvent se différencier en cas d'agression pulpaire. Ainsi, les odontoblastes détruits peuvent être remplacés par de nouvelles cellules pseudo-odontoblastiques (*odontoblast-like*), issues de la différenciation des cellules mesenchymateuses indifférenciées (Nakashima, Akamine 2005; Huang 2008; Huang 2009; Huang, Gronthos et al. 2009; Scheller, Krebsbach et al. 2009; Sun, Jin et al. 2011).

Les thérapeutiques de maintien de la vitalité pulpaire par formation d'un pont de dentine réparatrice, après une lésion pulpaire réversible, reposent sur ce principe. Cependant, le pronostic d'un coiffage pulpaire dans les cas de caries dentinaires profondes ou de traumatismes reste assez imprévisible et doit donc être limitée à quelques cas bien sélectionnés (Bashutski, Wang 2009). En effet, les résultats de cette thérapie sont très dépendants du type d'effraction pulpaire, de l'état inflammatoire de la pulpe, de l'âge de la dent, des modalités de traitement (choix du matériau de coiffage) et de l'étanchéité de la restauration (Mjor 2002; Murray, Windsor et al. 2002; Ward 2002; Murray, About et al. 2003; Tziafas 2004). De plus, le diagnostic clinique du degré d'inflammation pulpaire est délicat à poser, il n'existe pas actuellement de lignes directrices fondées sur la preuve, permettant aux cliniciens de déterminer quels cas méritent d'être traités par coiffage pulpaire (Huang 2008; Sun, Jin et al. 2011). De fait, il n'est pas rare que les dents ainsi traitées nécessitent ensuite un traitement endodontique.

Les progrès dans la compréhension de la composition moléculaire et des mécanismes cellulaires qui régulent la dentinogenèse offrent de nouvelles voies de

recherche régénérative, dans lesquelles la pulpe endommagée est éliminée partiellement ou entièrement et remplacée par un tissu pulpaire sain issu de la régénération pulpaire. Ainsi, il est d'usage de distinguer la régénération partielle *in situ* de la pulpe, de la synthèse *de novo* et donc du remplacement total de la pulpe (Nakashima, Akamine 2005; Huang, Gronthos et al. 2009; Sun, Jin et al. 2011).

## B. ***Régénération partielle in situ de la pulpe***

Les biotechnologies visant à la régénération partielle de la pulpe sont basées sur l'observation que l'inflammation pulpaire est compartimentée dans un premier temps avant que l'ensemble du tissu ne soit concerné (Huang 2008; Huang 2009; Huang, Gronthos et al. 2009). Les données actuelles suggèrent que la partie saine de la pulpe pourrait non seulement être conservable mais surtout avoir le potentiel pour régénérer la partie perdue (Huang 2009). Afin de favoriser cette régénération, des dispositifs médicaux inductifs ou des pulpes artificielles, constituées de DPSCs peuvent être insérés dans l'espace pulpaire libéré pour faciliter la récupération totale du tissu et la génération d'une nouvelle dentine (Huang 2009; Sun, Jin et al. 2011).

Avant même l'identification des DPSC, la régénération pulpaire a été étudiée en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* de culture de cellules pulpaires sur des polymères synthétiques d'acide polyglycolique (PGA) (Mooney, Powell et al. 1996; Bohl, Shon et al. 1998; Buurma, Gu et al. 1999). Ces études ont posé les bases de l'ingénierie tissulaire pulpaire en montrant que des tissus apparentés à la pulpe pouvaient être ainsi obtenus *in vitro* (Mooney, Powell et al. 1996; Bohl, Shon et al. 1998) et qu'ils survivaient lors d'implantations ectopiques sous-cutanées chez la souris immunodéprimée (Buurma, Gu et al. 1999). Depuis, les connaissances sur les cellules progénitrices de la pulpe, ont permis de différencier les cellules souches afin leur faire synthétiser de la dentine *in vitro* puis *in vivo* après implantation dans une canine de chien (Iohara, Nakashima et al. 2004). L'utilisation de matrices implantables, ensemencées de cellules souches, a permis de régénérer très partiellement des pulpes lésées chez le chien (Huang, Yamaza et al. 2010).

Techniquement, cette approche consiste à éliminer le tissu pulpaire caméral puis à mettre en place dans la chambre pulpaire une matrice cellularisée ou non cellularisée réalisée au

préalable. *In vitro*, la réalisation d'un tissu reproduisant le parenchyme pulpaire est réalisé. Deux modèles de régénération pulpaire partielle ont été proposés et expérimentés chez l'animal. Le premier modèle consiste à implanter un culot de DPSCs autologue au niveau d'une pulpotomie partielle, le second à mettre en place une matrice de collagène ensemencée de cellules souches triées (CD31-, CD146-) dans la chambre pulpaire après pulpotomie chez l'animal.

Notre approche de la régénération pulpaire s'est donc concentrée sur la régénération partielle, dont la mise en œuvre semble plus simple. Une fois la régénération partielle maîtrisée, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de cicatrisation permettra d'aborder la synthèse de novo de la pulpe dentaire.

Les concepts d'ingénierie tissulaire appliqués à la pulpe dentaire ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* (Mooney, Powell et al. 1996). Le collagène constitue l'élément principal de la matrice extracellulaire de la pulpe dentaire et l'implantation *in vivo* de matrices collagéniques ensemencées de cellules ont montré la possibilité de vascularisation de ces matrices. Afin de ne pas créer une inflammation liée à la dégradation de produits de la matrice, le collagène de type I semble parfaitement adapté.

Les traitements de revascularisation sont proposés lors d'atteintes pulpaires sur des dents permanentes immatures. Cette technique semble intéressante mais limitée aux dents très immatures. La nature du tissu présent dans le canal et la possibilité d'allongement radiculaire font l'objet de débats (Neha, Kansal et al. 2011; Nosrat, Seifi et al. 2011; Andreasen, Bakland 2012)

### ***C. La synthèse de novo de la pulpe:***

Lorsque le tissu pulpaire est entièrement détruit, la synthèse *de novo* de la pulpe doit avoir lieu dans le but de régénérer le tissu. Le volume de la pulpe mature est très faible (environ 10-100 µl), par conséquent, la régénération de la pulpe devrait être relativement plus simple que celle pour les grands organes ou de tissus. Cependant, ce tissu est considéré comme un tissu difficile à concevoir et à régénérer en raison des caractéristiques suivantes: 1) une situation unique anatomique des tissus de la pulpe contenus dans une cavité ayant un foramen apical étroit, compliquant l'angiogenèse lors de l'ingénierie tissulaire; 2) la structure

du tissu pulpaire, les différents types de cellules (par exemple, les odontoblastes) en différents couches et zones d'innervation.

Récemment, plusieurs équipes ont montré la faisabilité de l'implantation et de la survie de cellules dans la dent *in vivo*. L'équipe d'Huang (Huang 2009) a montré la réalisation de tissu minéralisé par l'implantation de cellules parodontales dans chambre pulpaire de la canine de chien. Iohara *et al* (Iohara, Murakami et al. 2013) montrent une régénération pulpaire à partir de différentes cellules souches, leur permettant d'obtenir un tissu pulpaire vascularisé et innervé.

#### ***D. Ingénierie tissulaire***

Un type de cellules mésenchymateuses souches de la pulpe dentaire humaine a été identifiée par Gronthos et Shi (Gronthos, Mankani et al. 2000). Ces cellules ont été nommées après l'éruption dentaire, cellules souches pulpaires (DPSC) et ont montré leur aptitude à former un complexe dentine/odontoblaste *in vitro*. En dehors des DPSC, plusieurs autres types de cellules souches ou progénitrices de tissus dentaires ont été isolés et caractérisés, ce sont les cellules souches des dents de lait exfoliées (SHED), les cellules souches du ligament (PDLSCs), des cellules souches de papille apicale (SCAPs) et les cellules souches du follicule (DFPCs). De nombreuses études *in vitro* montrent le potentiel de différenciation des cellules souches pulpaires en de très nombreux types cellulaires (Kim, Xin et al. 2010). *In vivo*, ces cellules ont aussi démontré leur capacité de régénération tissulaire. Les cellules souches pulpaires ont été utilisées pour la régénération osseuse (d'Aquino, Graziano et al. 2007; Graziano, d'Aquino et al. 2007). La réparation du muscle cardiaque a été permise par des cellules souches dentaires (Gandia, Arminan et al. 2008). Des études portant sur l'utilisation de cellules souches dentaires dans les dystrophies musculaires ont été réalisées (Kerkis, Ambrosio et al. 2008). Plus récemment *in vivo*, les DPSCs ont été utilisées pour la régénération tissulaire nerveuse (de Almeida, Marques et al. 2011). Au niveau dentaire, des cellules souches pulpaires ont été utilisées pour réparer des défauts osseux parodontaux (Mohamadreza, Khorsand et al. 2012).

Aujourd'hui, différentes sociétés privées proposent de cryoconserver les cellules souches pulpaires (Genecell International®, USA) issues de dents extraites. Les cellules conservées pourraient ainsi être utilisées dans le cadre de thérapies impliquant les cellules souches.



Pour le moment, ces sociétés privées n'interviennent pas en France et dans la plupart des pays européens. Ces « banques » de cellules permettraient un accès rapide aux cellules et la réalisation en un délai court de matrices implantables chez les patients.

La thérapie cellulaire est efficace pour la réparation de défauts de taille importante. L'approche des cellules souches fournit de meilleurs résultats en raison de leurs capacités de division et de différenciation en réponse à des signaux micro-environnementaux. En raison de ces caractéristiques, l'emploi de cellules souches pulpaire en vue de la régénération pulpaire paraît être la meilleure voie.

### ***E. Régénération partielle de la pulpe***

Cette technique repose sur le fait que l'inflammation pulpaire reste compartimentée un certain temps, avant que l'ensemble du tissu ne soit atteint (Huang 2009). Les données actuelles suggèrent que la partie saine de la pulpe pourrait être conservée et aurait, de plus, le potentiel pour régénérer la partie perdue (Huang 2009). Afin de permettre cette régénération, des dispositifs médicaux inductifs ou des reconstructions d'ingénierie tissulaire de pulpe basées les DPSC, peuvent être insérés dans l'espace pulpaire (Huang 2009).

L'angiogenèse est l'un des points clefs pour la survie des matrices implantées dans la dent, mais elle est compliquée par le faible diamètre du foramen apical. La conservation du parenchyme pulpaire canalaire permet de s'appuyer sur la vascularisation radiculaire déjà en place et de mettre la matrice directement en contact avec les vaisseaux présents.

### **III. Objectifs**

Ce travail s'inscrit dans un projet global du laboratoire d'ingénierie orofaciale à partir des cellules souches mésenchymateuses. Il a pour buts de poser les jalons de la régénération pulpaire, à travers la mise au point d'une pulpe équivalente implantée dans un modèle murin. Nous nous sommes placés dans un contexte de régénération pulpaire partielle, en utilisant une population de cellules pulpaires hétérogènes. Pour l'ensemble des manipulations *in vivo*, nous avons travaillé en allogreffe.

## **IV. Matériel et méthodes**

Tous les protocoles d'expérimentation animale de cette étude ont été préalablement approuvés par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (N° CEA34.CC.010.11).

## **A. Matériel**

### **1. Cultures cellulaires**

Les cellules pulpaire sont préalablement cultivées en 2 dimensions d'après le protocole de Gronthos et coll. (Gronthos, Mankani et al. 2000), avant l'implantation dans les matrices de collagène.

#### ➤ Cellules pulpaire humaine

Avec l'accord du patient, des dents de sagesse extraites (patients en bonne santé générale, âgés de 18 à 30 ans) sont collectés dans les centres hospitalo-universitaires de l'hôpital Bretonneau à Paris et de l'hôpital Louis-Mourrier à Colombes. Les surfaces dentaires sont désinfectées avec une solution de polyvidone iodine (Betadine®). Dans un environnement stérile, les dents sont fracturées et la pulpe dentaire isolée et disséquée en blocs d'1 à 2 mm de large. Ces blocs sont incubés à 4°C pendant 1h dans une solution de PBS 1X, 1% fongizone, 1% pénicilline/stréptomycine puis 2h à 37°C dans une solution de PBS 1X, collagénase de type I, 3mg/ml (Worthington Biochem, Freehold, NJ) et dispase, 4 mg/ml (Boehringer, Mannheim, Germany). La digestion enzymatique est stoppée par ajout d' $\alpha$ -MEM, 20%SVF. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée (1000 g) pendant 5 min. Les cellules sont resuspendues et mises en culture dans des flasques T12.5 (Falcon) avec du  $\alpha$ -MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplémenté avec 20% de SVF, 1% pénicilline/stréptomycine à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux sont renouvelés 2 fois par semaine.

#### ➤ Cellules pulpaire de rat

Des rats LEWIS (Janvier) âgés de 5 jours sont sacrifiés afin de prélever les germes de molaires qui sont mis en culture selon le même protocole que celui des cellules humaines. Dans ce cas nous utilisons des flasques T12.5 (Falcon) coatées à 0.1% de gélatine. Nous utiliserons également de l' $\alpha$ -MEM, 20% SVF, 1% pénicilline/stréptomycine, 1ng/ml FGF2. Les milieux sont renouvelés 2 fois par semaine.

## **2. Préparation des matrices**

Les cellules pulpaire préablement cultivées en 2 dimensions, selon Gronthos (Gronthos et al., 2000), seront ajoutées lors de la polymérisation du collagène de type I, (Bell et al., 1979; Coulomb et al., 1998; Miller et al., 2003). En bref, le pH de la solution de collagène sera ajusté à 7,4, les cellules de la pulpe seront ajoutées pour ajuster la concentration finale à 2 millions de cellules/ml, le milieu de culture (DMEM, 1 PS%) ajouté sans sérum.

Du collagène de type I est extrait de tendons de queue de rat dans une solution d'acide acétique selon le protocole de (Bell, Ivarsson et al. 1979; Coulomb, Friteau et al. 1998; Chaussain Miller, Septier et al. 2002).

La préparation de 10 matrices ensemencées nécessite le mélange sur glace de collagène de type I 1 mg/ml, 1X de DMEM, 1X de bicarbonate de soude et du DMEM sans sérum contenant les cellules ( $8 \times 10^5$  cellules/matrice).

Ce mélange est versé dans une plaque de culture pour suspension cellulaire, afin d'empêcher l'adhérence des cellules sur le fond du puits, et incubé 1 heure à 37° C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Après cette heure de polymérisation du collagène, du DMEM, 1% PS sans sérum est ajouté.

Ces matrices constituent les « pulpes équivalentes » et restent dans l'incubateur de 4 à 24 heures avant leur implantation.

## **3. Marquage à l'oxyne-Indium 111**

Pour les expérimentations avec marquage radioactif, la manipulation s'est faite au laboratoire d'Anne Gruaz (Inserm Crb3).

Les DPSCs sont classiquement rincées au PBS1X puis détachées par de la trypsine 0,05% /EDTA à 0,02% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à 37°C puis centrifugées à 1000 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu et la concentration cellulaire est mesurée à l'aide d'une cellule de Malassez.

Pour réaliser le marquage,  $25.10^6$  cellules sont mélangées avec 51,5 MBq d'oxyne-Indium 111 (Covidien Pharmaceuticals, Elancourt, France) et 1 ml de tampon Tris du kit de marquage puis incubées pendant 30 min à 37° C. Les cellules sont ensuite rincées deux fois

avec du DMEM sans sérum, et les concentrations de radioactivité des surnageants et culots cellulaires sont mesurées dans un compteur (Cobra II, Packard, USA).

Le rendement de marquage à l'oxyne-Indium 111 peut ainsi être déterminé, il est exprimé par le rapport du comptage des cellules en suspension après le lavage (comptages des cellules) sur le surnageant du culot (activité totale obtenue juste après le marquage).

Dans nos expérimentations chez le rat, le contrôle choisi est constitué de matricesensemencées de cellules marquées radioactivement, puis lysées, avant mélange avec le collagène. La lyse cellulaire est obtenue par la suspension du culot cellulaire dans une solution hypotonique (eau distillée) pendant 5 min.

## ***B. In vivo***

### **1. Implantation ectopique**

Les 6 rats utilisés lors de cette manipulation sont des rats LEWIS (Janvier) de 6 semaines Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une solution de 0.1 ml/10g de kétamine 20% (Imalgène 500, Bayer Pharma) et xylazine 5% (Rompun 2%, Merial Inc.). Le rat est placé en décubitus ventral. Le dos est rasé puis désinfecté (Betadine®). Une incision est pratiquée à l'aide d'un bistouri côté droit du rat puis une poche sous cutanée réalisée à l'aide de ciseaux. Un lattis avec ou sans cellules est disposé dans la poche sous-cutanée. Les berges de la plaie sont suturées (fil non résorbables, 4-0, Ethicon®). La même opération est répétée côté gauche avec une matrice sans cellules si le côté droit a reçu une matrice cellularisée et vice-versa Le sacrifice de 3 animaux a eu lieu 15 jours après l'implantation et les 3 autres animaux 30 jours après l'implantation.

### **2. Implantation dans la dent**

Le modèle expérimental consiste à faire évoluer le modèle d'effraction pulpaire, utilisé depuis de nombreuses années dans le laboratoire (Decup, Six et al. 2000; Lacerda-Pinheiro, Jegat et al. 2006; Jegat, Septier et al. 2007; Six, Septier et al. 2007; Goldberg, Farges et al. 2008; Tran, Gorin et al. 2012).

Les 10 rats (5 rats implantés avec des cellules lysées, 5 rats avec des cellules entières) sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une solution de 0.1 ml/10g de kétamine

20% (Imalgène 500, Bayer Pharma) et Xylazine 5% (Rompun 2%, Merial Inc.). Au niveau de la première molaire maxillaire, une cavité occlusale est réalisée par fraisage (fraise boule surtaillée, ISO 005, Maillefer, turbine Kavo GentleSilence) sous microscope (Zeiss, Pico) permettant l'accès à la chambre pulpaire. Le plafond de la chambre pulpaire est ensuite effondré et l'exérèse du parenchyme pulpaire camérale complétée. L'hémostase est obtenue par compression à l'aide de cônes de papier stériles. Les matrices cellularisées sont mises en place dans l'espace qu'occupait la pulpe camérale. La cavité d'accès est ensuite isolée de façon étanche par la mise en place d'un ciment biocompatible (Biodentine, Septodont) puis d'une couche de composite photopolymérisable (FloRestore, Denmat). Les rats sont ensuite sacrifiés à 1 mois.

## ***C. Techniques d'imagerie***

### **1. $\mu$ scanner**

Le système (Microscanner Skyscan 1172#060 – Caméra CCD 5x10 cm) est composé d'un tube radio fixe et d'un capteur CCD. Les images ont été obtenues à 80 V et 100  $\mu$ A, un filtre Aluminium d'1 mm d'épaisseur étant mis en place. Les échantillons étaient placés dans un cryotube contenant de l'alcool 70°, le bouchon de ce cryotube rendu solidaire de l'axe de rotation du micro-scanner. Pour chaque échantillon, une série de 400 acquisitions a été faite avec une rotation de 0,45° entre chaque image. Les séries d'acquisition ont ensuite été reconstruites pour chaque échantillon, enregistrées sous le format DICOM puis analysées.

### **2. SPECT**

Les cellules précédemment décrites ont été marquées à l'oxyne-Indium 111 (Covidien Pharmaceuticals, Elancourt, France) avant leur mise en place chez les rats. Cette technique permet de localiser les cellules marquées grâce aux méthodes de scintigraphie. Le système NanoSPECT/CT de Bioscan a été utilisé, il permet notamment de superposer en 3D le signal du marqueur et l'anatomie donnée par l'acquisition au scanner.

Les acquisitions scanner ont été réalisées pendant 9 minutes (acquisition de la tête uniquement), 25 min (corps entier) à 55kVP.



Les acquisitions SPECT ont été réalisées pendant 15 min minutes (acquisition de la tête uniquement), 35 min (corps entier).

### **3. Autoradiographie**

Après cryofixation à l'azote liquide, les matrices cellularisées ont été passées au cryotome après inclusion en OCT® afin d'obtenir des coupes de 20µm d'épaisseur déposées sur une lame de verre. Les lames ont été rendues conductives par l'application d'adhésif métallisé du côté libre de la lame puis placée dans la chambre du beta-imageur (BIOSPACE LAB), sous atmosphère partielle d'argon. Les données ont été acquises durant toute la nuit.

### ***D. Analyse histologique***

Lors du sacrifice, après anesthésie, la fixation des tissus est réalisée par une perfusion intracardiaque de para-formaldéhyde à 4%. Les maxillaires sont prélevés, puis immergés dans une solution de para-formaldéhyde à 4% pendant 5 jours. La déminéralisation est réalisée par immersion dans une solution d'acide nitrique à 7% pendant 36 heures.

Les pièces histologiques sont ensuite déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools croissants puis de toluène, avant inclusion dans la paraffine (Paraplast®). Des coupes longitudinales de 7 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome.

Les coupes en paraffine sont déparaffinées dans des bains de toluène et réhydratées dans des bains d'alcool décroissants avant coloration ou immunohistochimie.

### **1. Coloration à l'Hémalun-éosine**

Cette coloration permet l'observation histologique des tissus dentaires et périodontaires.

Les coupes déparaffinées et réhydratées sont plongées dans un bain d'hémalun pendant 4 minutes. Après rinçage, elles sont immergées durant 4 minutes dans un bain d'éosine puis rincées à l'eau acétifiée.

Un dernier rinçage à l'eau puis la déshydratation en alcools croissants et enfin en bain de toluène précèdent le montage des lames au DPX®. L'observation peut ensuite se faire en microscopie photonique.

## **2. Coloration au Trichrome de Masson**

Cette coloration a été employée pour l'étude histologique des matrices placées dans le dos des animaux.

Les coupes déparaffinées et réhydratées sont plongées dans un bain d'hémalun pendant 4 minutes. Après rinçage, elles sont immergées durant 4 minutes dans de la Fuchsine Ponceau puis rincées à l'eau acétifiée, 5 %. Elles sont ensuite plongées dans l'Orangé G-Molybdique, 4 min, à nouveau rincées à l'eau acétifiée puis contre-colorées au Vert-Lumière pendant 5 min.

Un dernier rinçage à l'eau puis la déshydratation en alcools croissants et enfin en bain de toluène précèdent le montage des lames au DPX®. L'observation peut ensuite se faire en microscopie photonique.

## **3. Immunohistochimie**

L'immunohistochimie permet de localiser une protéine d'intérêt dans le tissu grâce à la liaison spécifique d'un anticorps primaire (mono- ou polyclonal) ciblant notre antigène recherché. Cet anticorps primaire est mis en évidence par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase.

Les coupes sont déparaffinées et déshydratées selon le protocole classique.

Les lames sont immergées pendant 30 minutes dans un bain de méthanol (150 mL) à 0,4 % de peroxyde d'hydrogène à 30% (600 µL)

Le blocage des sites antigéniques non spécifiques se fait directement par immersion des lames dans une solution de PBS 1X-BSA à 1%

L'anticorps anti facteur Von Willebrand (FvW) dilué au 1/200 (Abcam ab-6994), l'anticorps anti-CGRP, « Calcitonine gene related peptide » (CGRP) dilué au 1/2000 (Sigma-Aldric C189), l'anticorps anti-Proliférating Cell Nuclear Agent (PCNA), dilué au 1/200 (Calbiochem) ou l'anticorps anti alpha-Smooth Muscle Actin (SMA) dilué au 1/300 (Abcam ab-5694) sont déposés sur les coupes et incubés 1h30 en chambre humide à température ambiante.

Les lames sont ensuite incubées en chambre humide pendant 1h30 avec l'anticorps secondaire, concentré au 1/100ème (couplé à une peroxydase).

Les lames sont immergées dans une solution de 3-3' Diaminobenzidine (DAB) à 0,04% de peroxyde d'hydrogène 30% (40 mg de DAB, Sigma, 150 mL de PBS1X et 60  $\mu$ L d' $H_2O_2$ ) pendant 20 min à température ambiante. Entre chaque étape, les lames sont soigneusement rincées au PBS 1X/BSA 1%.

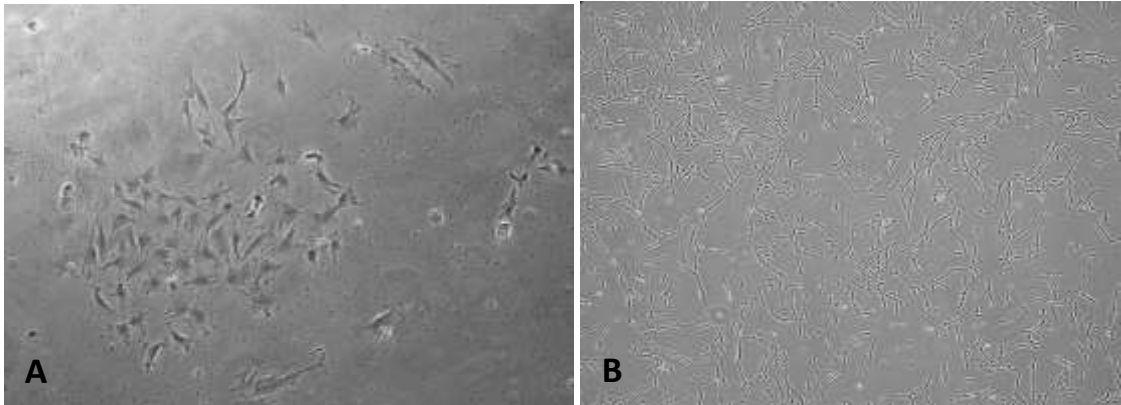
Les lames sont ensuite montées en milieu aqueux (DEPEX) afin d'être observées en microscopie photonique.

## **V. Résultats**

## **A. Mise au point du modèle**

### **1. Prélèvement et culture de cellules pulpaire de rat**

Afin de pouvoir implanter les cellules pulpaire chez d'autres rats, des rats LEWIS sont utilisés. Les germes de molaires sont extraits chez des rats âgés de 5 jours, les pulpes sont ensuite disséquées et mises en culture selon le protocole.



**Figure 10 : Cellules pulpaire de rat (P0) en culture (A) et cellules pulpaire humaine (B)**

Diverses conditions de cultures ont été testées, et les meilleurs résultats en termes de prolifération ont été obtenus avec de l' $\alpha$ MEM supplémentés à 20% SVF, 1% PS. Le phénotype des cellules pulpaire de rat est légèrement différent par rapport aux cellules pulpaire humaine: les cellules pulpaire de rat apparaissent moins fusiformes que les cellules humaine (Fig.10)

### **2. Mise au point de la culture en 3D**

La culture de cellules en 3 dimensions est une étape essentielle en vue de l'implantation de matrice à la place du parenchyme pulpaire caméral. En effet, l'environnement en 3 dimensions permet de replacer les cellules dans des conditions proches des conditions physiologiques.

Les différents tests d'ensemencement cellulaire et le contrôle de la densité cellulaire par des coupes histologiques des lattis ont permis de déterminer une densité cellulaire optimale à 1 million de cellules pour 100  $\mu$ l.

La prolifération au sein des matrices, a été mise en évidence. En effet, nous avons constaté une augmentation du nombre de cellules jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de culture (Fig.11).

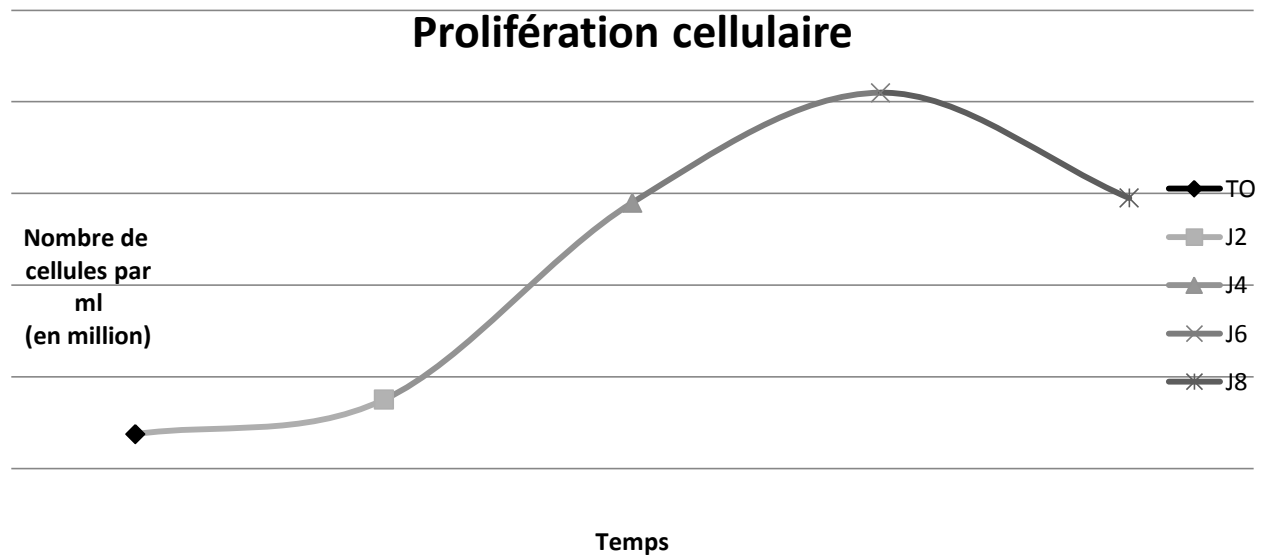


Figure 11 : Analyse de la prolifération cellulaire dans les matrices de collagène

Les cellules pulpairees sont capables de proliférer au sein d'une matrice de collagène I.

L'analyse de la répartition des cellules au sein des matrices et de la radioactivité a été réalisée par microscopie optique et par autoradiographie de cellules marquées à l'oxyne-Indium. Les premières matrices fortementensemencées montraient une mauvaise répartition des cellules (figures 12 et 13, A) au sein de la matrice avec la présence d'agrégats.

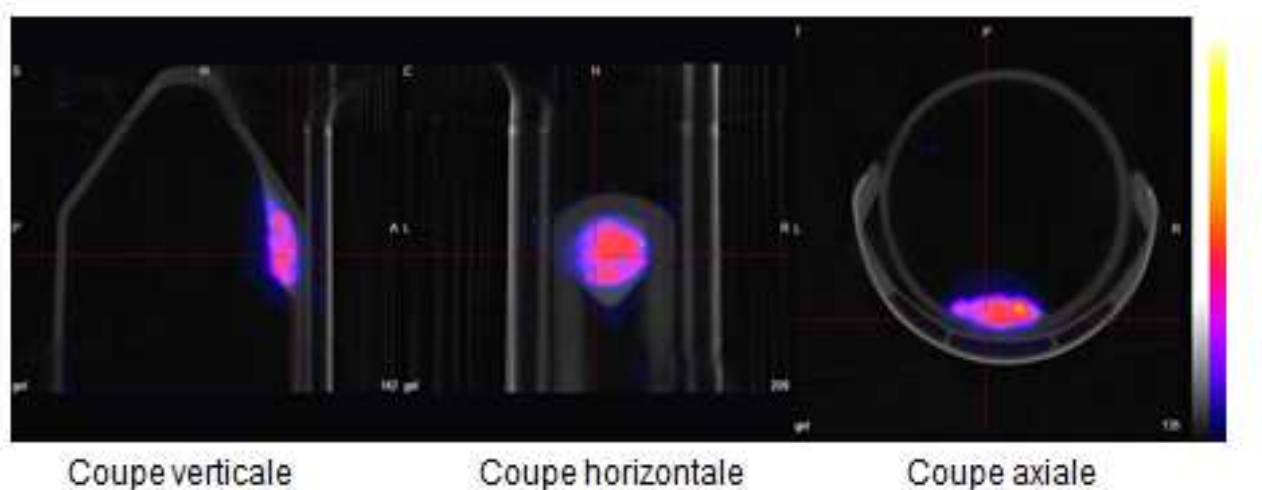


Figure 12: Imagerie de SPECT / CT d'un essai de marquage de cellules pulpairees dans une matrice collagénique

L'amélioration du protocole d'ensemencement des cellules lors de la réalisation des matrices a permis d'obtenir une répartition homogène des cellules au sein de ces matrices (figure 4, B). L'autoradiographie des coupes de matrices cellularisées montre une répartition homogène des cellules au sein des matrices.

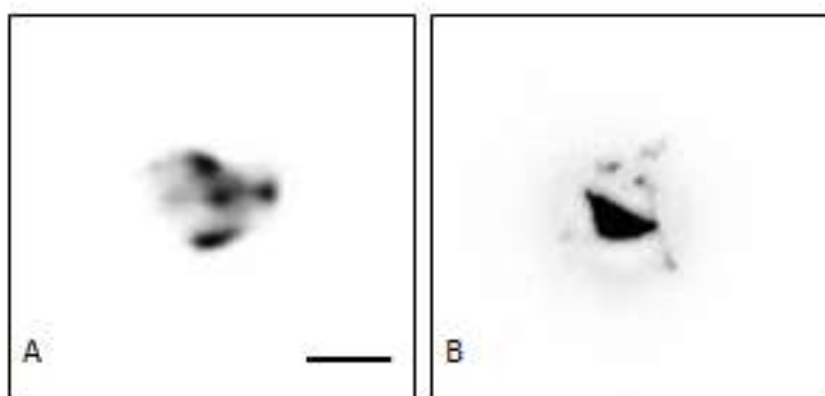


Figure 13 : Imageries obtenues par Beta imager

L'imagerie fournie par le beta-imager montre une répartition inhomogène lors des premiers essais (A) puis une répartition homogène au sein de toute la matrice (B) avec la nouvelle technique d'ensemencement.

### 3. Implantation ectopique

Avant de réaliser une technique complexe d'implantation dans la dent, la biocompatibilité des matrices cellularisées et non cellularisées a été testée *in vivo* en implantation ectopique. A 15 jours, les matrices étaient bien intégrées dans les tissus au niveau du site d'implantation, rendant difficiles leur localisation. A 1 mois, peu de matrices ont été retrouvées car parfaitement intégrées aux tissus du site d'implantation. Histologiquement, une absence d'inflammation était notée.

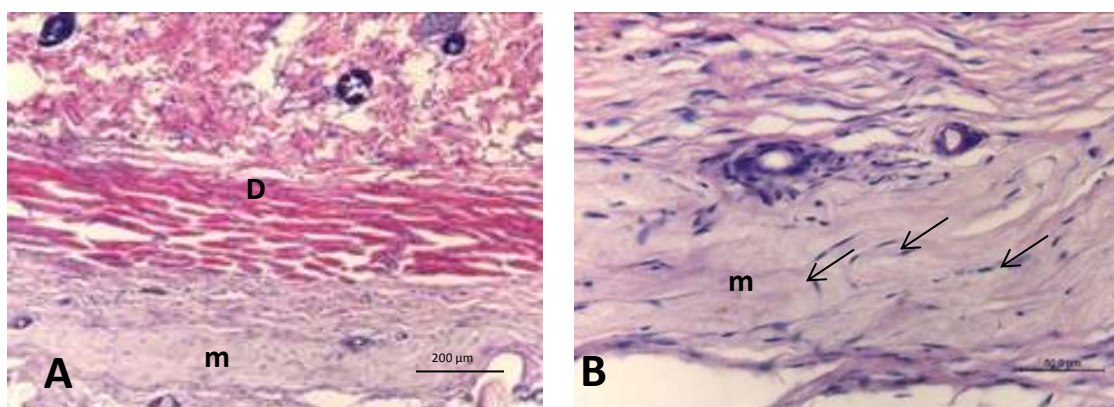


Figure 14 : Coupe d'une matrice cellularisée implantée en sous-cutané chez le rat

Coloration à l'Hémalun-éosine (m : matrice implantée, D : derme). La matrice est parfaitement intégrée aux tissus voisins (A). A plus fort grandissement, les cellules et les vaisseaux sont mis en évidence (B)

Les coupes histologiques colorées à l'hémalun-éosine montrent la présence de nombreuses cellules au sein des matrices cellularisées et d'une vascularisation au niveau de la matrice implantée (Figure 14, A, B).

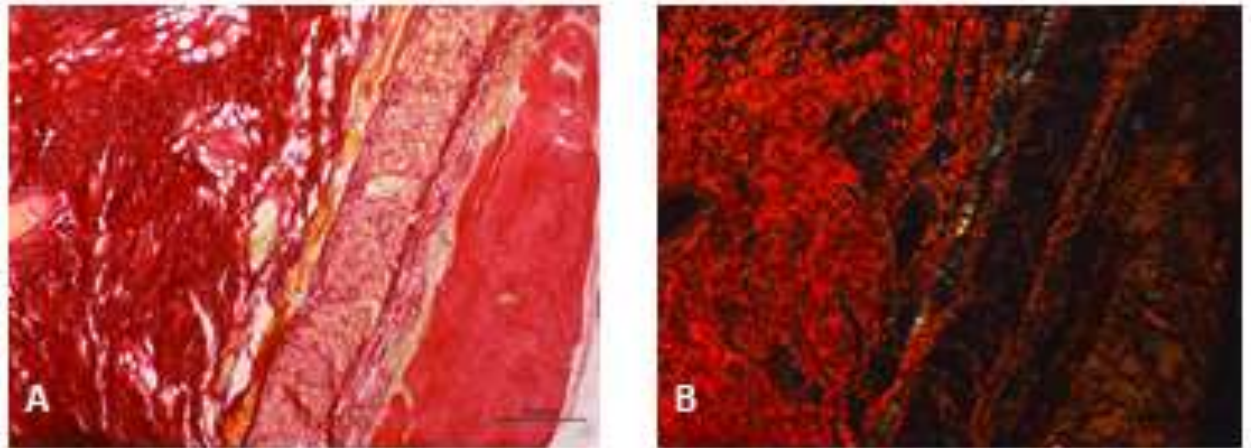


Figure 15 : Coupe histologique de matrice implantée (coloration au Rouge Sirius)

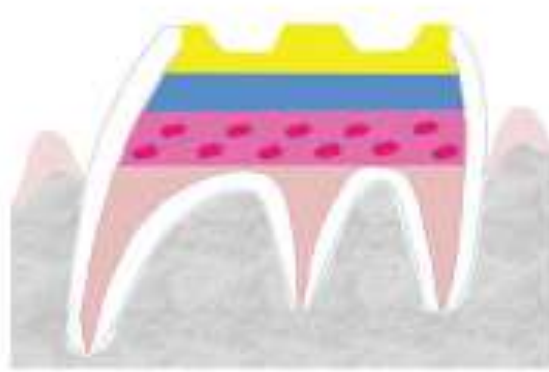
La coloration au rouge Sirius observée en lumière polarisée (Fig.15 B) ne montre pas d'organisation particulière des fibres de collagène (absence de « mineralization foci » au sein de la matrice), ne laissant pas suggérer de début de minéralisation de la matrice implantée.

Nous proposons ici une pulpe équivalente, composée d'une matrice de collagèneensemencée de cellules souches pulpaire. Ce modèle vise à reconstruire une matrice extracellulaire mimant l'environnement naturel des cellules. L'innocuité de nos matrices a été testée et montre une parfaite tolérance de l'organisme.

#### **4. Mise au point du modèle d'implantation dans la molaire de rat**

Le modèle traditionnel d'effraction pulpaire au laboratoire étant réalisé en routine, nous avons utilisé l'expérience acquise pour mettre au point le modèle de pulpotomie puis d'implantation de matrice dans la chambre pulpaire (Fig.16).

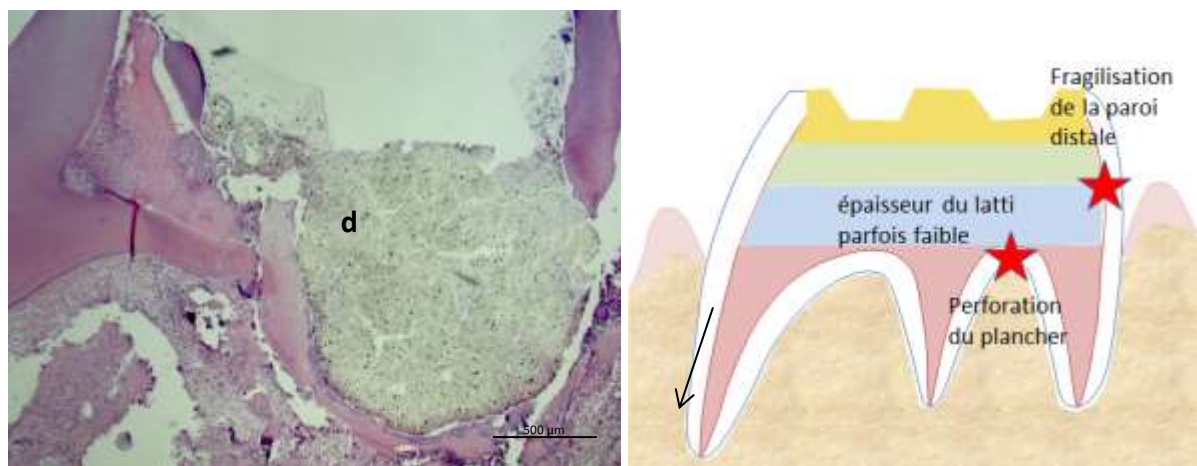




**Figure 16 : Schéma présentant les différents matériaux implantés**

Sur le plan théorique, la mise en œuvre semble relativement simple.

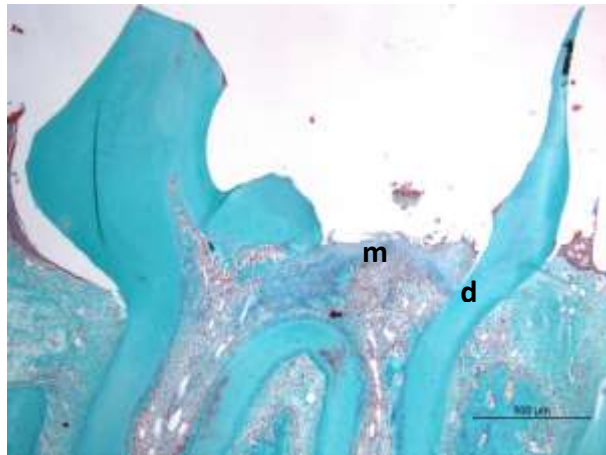
Un premier test utilisant des cellules sans marquage radioactif a permis de cerner les difficultés techniques (Figure 17).



**Figure 17 : Perforation du plancher pulpaire**

**La faible épaisseur des parois de dentine explique les perforations du plancher observées lors des premières tentatives. (Coloration à l'hémalun éosine)**

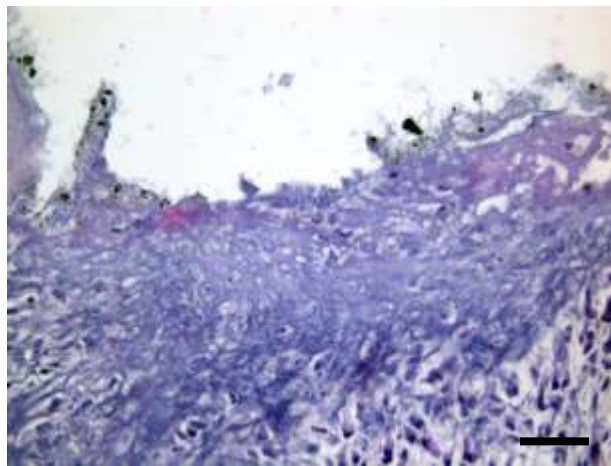
Les essais préliminaires ont pu mettre en évidence des fractures dentaires mésio-distales et de la crête marginale distale causées par une élimination trop importante des tissus minéralisés. En l'absence de fracture, aucune perte d'obturation n'a été notée (Figure 18). La matrice étant disposée sur une compresse stérile avant la mise en place dans la chambre pulpaire, son volume était diminué à cause de l'aspiration de liquide par le tissu, d'où un volume et une épaisseur trop faibles de cette matrice avant l'implantation. Il a suffi de déposer la matrice sur une plaque de culture cellulaire pour éviter ce problème.



**Figure 18 : Pulpotomie sans perforation**

Les essais ont permis d'optimiser les protocoles et d'obtenir une répétitivité des pulpotomies et mise en place des matrices.

L'un des points importants de cette technique d'implantation est la mise en place d'un ciment biocompatible au contact direct de la matrice cellularisée. Un silicate de calcium, Biodentine (Septodont) a été utilisé lors de nos expérimentations (Figure 19). Il n'a pas été noté de réaction inflammatoire au niveau de cette interface



**Figure 19 : Interface matrice / silicate de calcium (coloration hémalum-éosine)**

Les difficultés techniques ayant été surmontées, la réalisation de l'implantation de matrices dans la première molaire maxillaire de rat a pu être réalisée de façon répétitive.

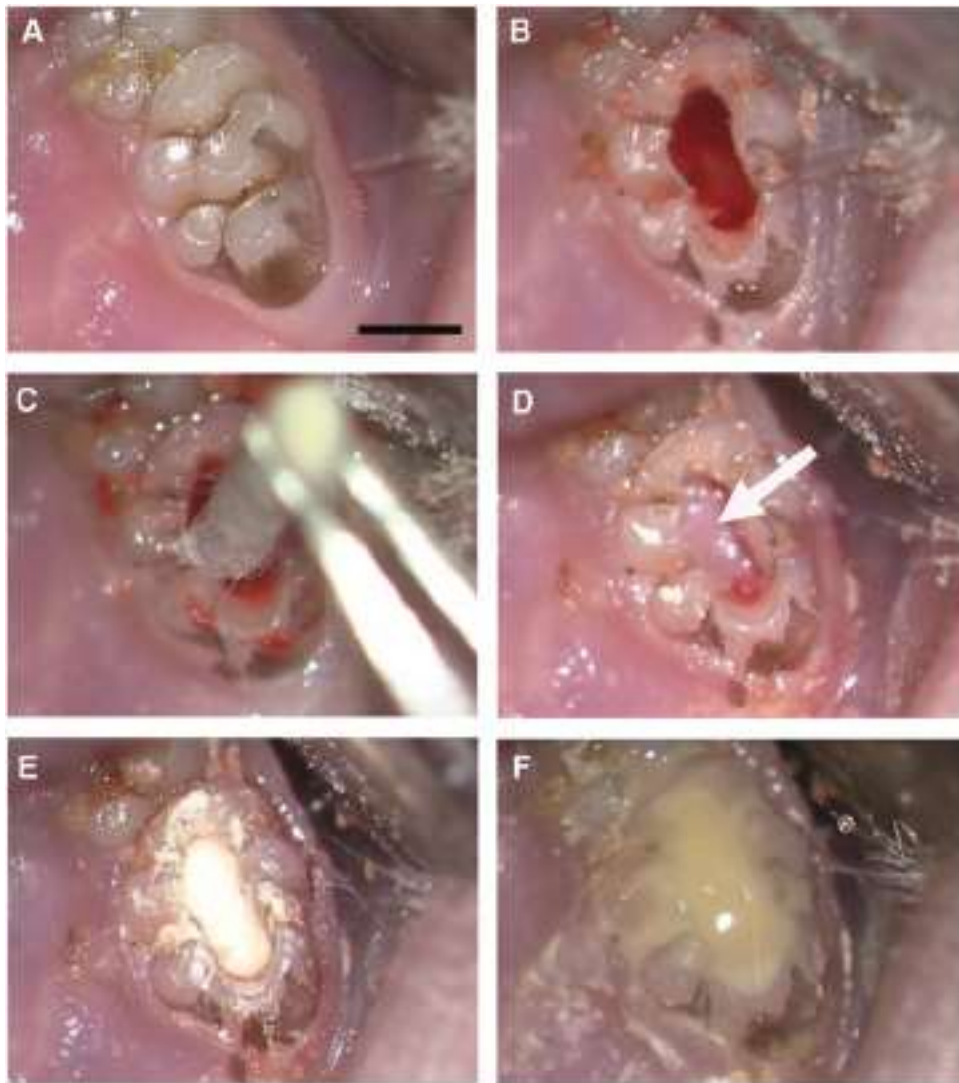


Figure 20 : Technique d'implantation des matrices dans la première molaire maxillaire de rat après pulpotomie

Le silicate de calcium n'ayant pas une résistance à l'abrasion suffisante, un adhésif et un composite flow sont utilisés (Figure 20).

L'analyse par  $\mu$ CT des essais a permis de constater le volume occupé par la matrice et la bonne stratification silicate de calcium et composite flow (Figure 21).

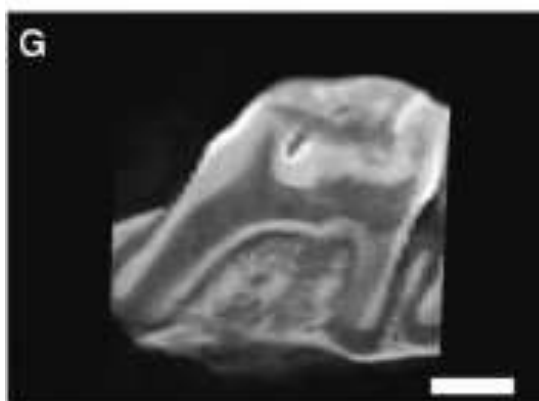


Figure 21 : Image de  $\mu$ CT juste après un essai d'implantation

La mise au point de la technique de pulpotomie suivie de l'implantation d'une matrice dans la chambre pulpaire puis la mise en place d'une restauration biocompatible étanche étaient compliquées par la faible taille des molaires de rat. La mise au point imposait l'obtention de la répétitivité des gestes, ce qui a été obtenu.

## **B. Suivi des cellules par imagerie nucléaire**

### **1. Cytotoxicité du marqueur**

L'isotope radioactif, l'Oxyne Indium (Oxinate D'indium Mallinckrodt, Covidien Imaging France), a été choisi car il est employé en routine dans le diagnostic oncologique et de l'inflammation chez l'homme, une évaluation de sa potentielle cytotoxicité à la fois sur les cellules de rat était nécessaire.

Chez le rat, le taux de marquage des cellules pulpaires était de 80 %. La prolifération et la survie cellulaire ont été analysés et ne sont pas statistiquement différentes entre les cellules marquées et non marquées (figure 22, A et B)

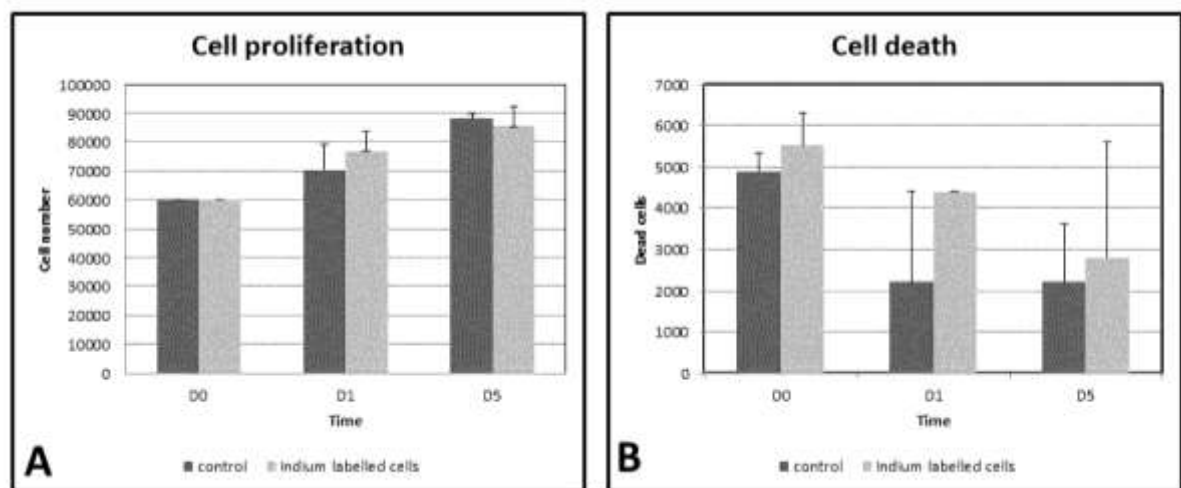


Figure 22 : Prolifération et survie des cellules pulpaires de rat avec et sans marquage radioactif

Le marquage à l'Oxyne Indium 111 ne modifie pas la prolifération cellulaire et la survie cellulaire de façon statistiquement significative.

La stabilité du marquage a aussi été évaluée *in vitro*, 2 heures après le marquage, l'élution est de seulement 5% de l'activité totale.

Parallèlement des pré-manipulations sur des cellules pulpaires issues de dents temporaires (SHEDs) ont été réalisées, avec un rendement de marquage de 80%, ce qui correspond au rendement observé pour les autres types cellulaires humains.

Le marquage à l'Oxyne-Indium a ainsi été validé pour les cellules pulpaires. D'autres types de cellules pulpaires présentent aussi de bons résultats au marquage radioactif et pourraient être utilisés dans des protocoles proches.

## 2. Suivi des cellules marquées

Le suivi *in vivo* par SPECT / CT après implantation a été réalisé sur des matrices ensemencées de cellules pulpaires marquées vivantes ou lysées. Le signal est détectable dans les dents implantées avec une matrice de cellules marquées pendant 3 semaines après implantation sans décroissance significative (après correction de la décroissance due à la demi-vie radioactive) au fil du temps pour les cellules entières ; au contraire le signal est très faible dès l'implantation pour les cellules lysées.

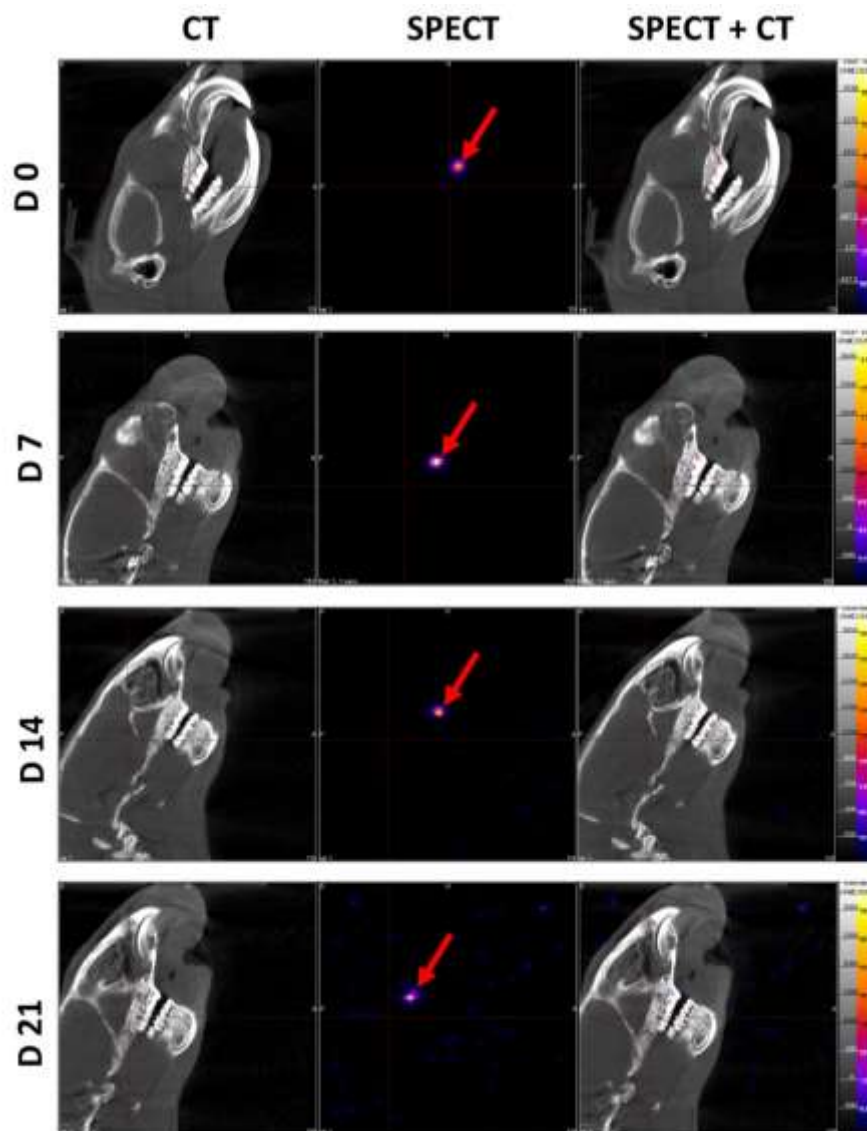
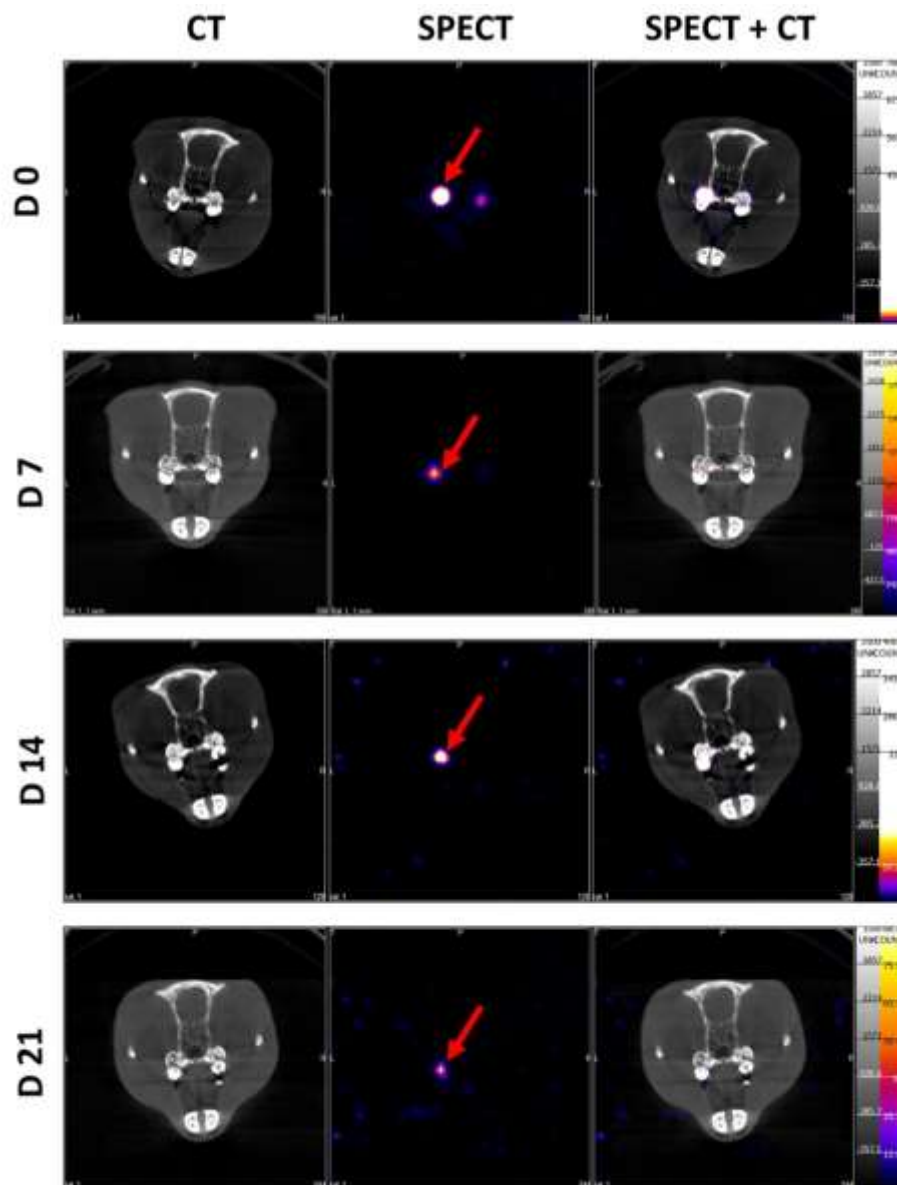


Figure 23 : Suivi par SPECT/CT d'une matrice cellularisée implantée dans une première molaire de rat

L'imagerie par SPECT/CT permet de valiser la bonne implantation de la matrice dans la dent juste après l'implantation puis de suivre le devenir des cellules après l'implantation grâce à leur marquage radioactif (figures 23 et 24).



**Fig. 3**

Figure 24. Reconstructions SPECT/CT chez un animal implanté avec des cellules entières (flèche rouge) et des cellules lysées (flèche bleue)

Le marquage est suivi pendant 21 jours. Le marquage de la matrice avec les cellules vivantes (flèche rouge) est plus fort que la matriceensemencée de cellules lysées (flèche bleue).

Le signal des matricesensemencées de cellules vivantes est 5 fois plus fort que celui des matrices contenant des cellules lysées (figure 25) alors que le marquage des cellules à l'oxyne Indium est strictement le même. Ce résultat montre une corrélation entre l'intégrité cellulaire et l'intensité du signal.



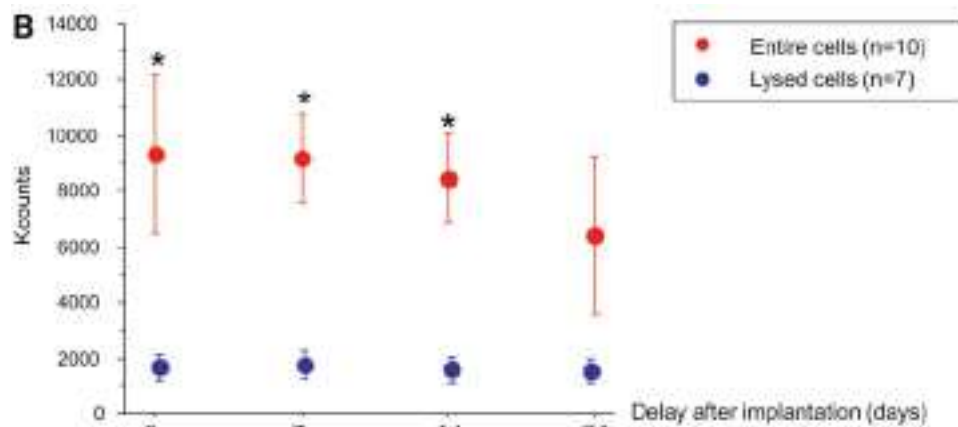


Figure 25. Quantification du signal des matrices implantées avec des cellules lysées et des cellules entières.

Le signal des cellules pulpaire vivantes est statistiquement plus important que le signal des cellules lysées à J0, J7 et J14.

Pour savoir si les cellules implantées restent localisées dans la chambre pulpaire ou se disséminent dans l'organisme, les zones crânio-faciales et l'ensemble du corps ont été scannées à l'aide du SPECT/CT. Aucun signal n'a été détecté en dehors de la chambre pulpaire pendant toute la durée du suivi, suggérant que les cellules implantées restent localisées dans la dent (Figures 26 et 27). Les organes d'élimination des débris cellulaires (foie, reins, rate ou poumon en cas de diffusion veineuse) ont été particulièrement scrutés et ne montrent aucun signal radioactif.

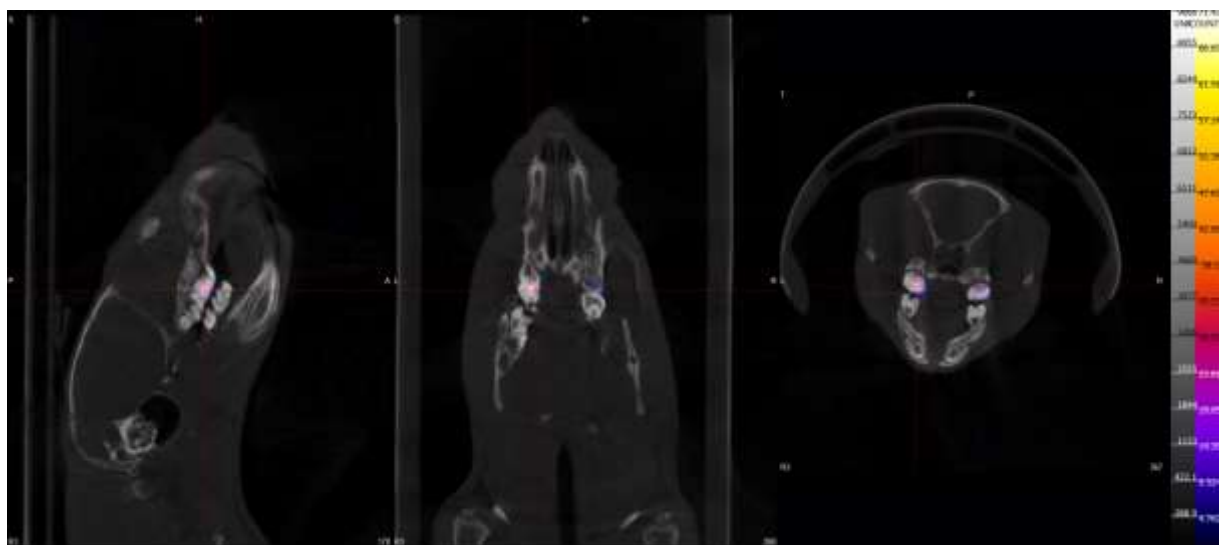


Figure 26 : Imagerie par SPECT/CT d'une tête de rat après implantation dans les premières molaires maxillaires. Aucun signal radioactif n'est retrouvé en dehors de la zone d'implantation.

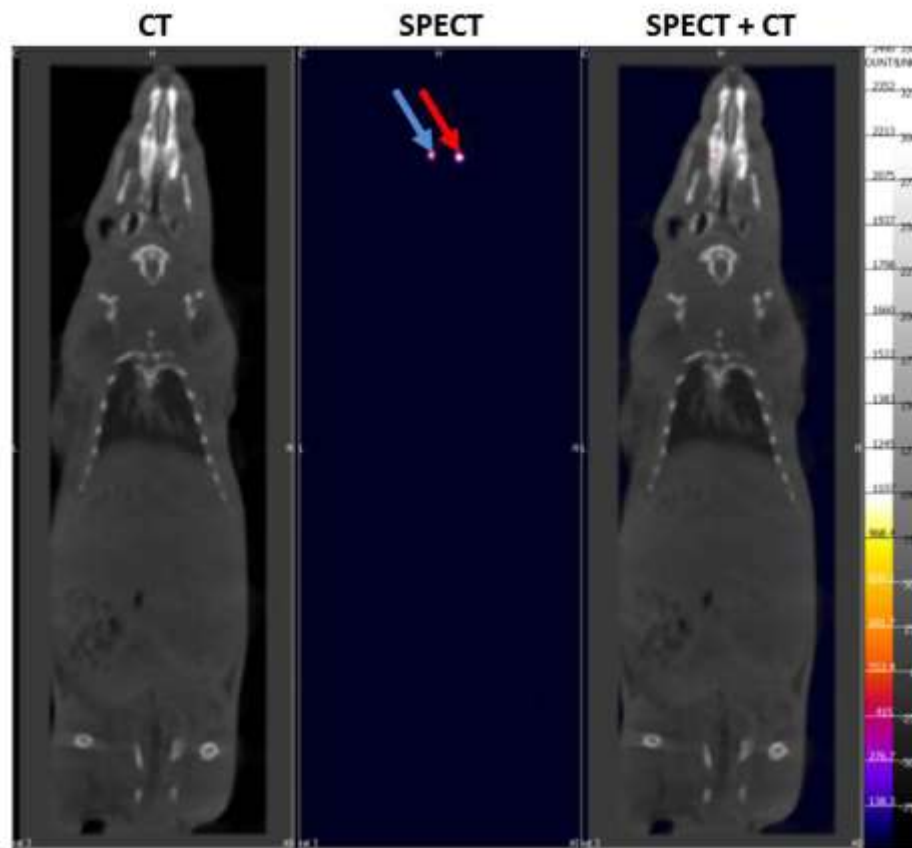


Figure 27. Reconstruction SCPET/CT d'une acquisition de corps entier.

L'acquisition des corps entiers ne montre pas de dissémination cellulaire en dehors de la zone implantée, aussi bien à proximité des dents qu'au niveau des organes d'élimination.

L'intensité du signal SPECT *in vivo* est liée à l'intégrité des cellules implantées, et a permis un suivi longitudinal non-invasif pendant au moins 3 semaines des cellules pulpaire implantées.

Aucun signal radioactif, à l'exception des premières molaires implantées, n'est mis en évidence au niveau crânio-facial, ni au niveau des organes d'élimination.



### C. Fonctionnalité du tissu

Le processus de réparation a été examiné par les techniques histologiques classiques et à l'aide d'un  $\mu$ CT haute résolution.

#### 1. Analyse histologique

De nombreux fibroblastes sont retrouvés dans la matrice de collagène ensemencées de cellules vivantes. Plusieurs de ces cellules sont immunomarquées pour le PCNA (proliferating nuclear agent), indiquant une activité mitotique de ces cellules. Dans les matrices ensemencées de cellules lysées aucune cellule n'est retrouvée, que ce soit par la coloration histologique ou par immunomarquage du PCNA (Figure 28).

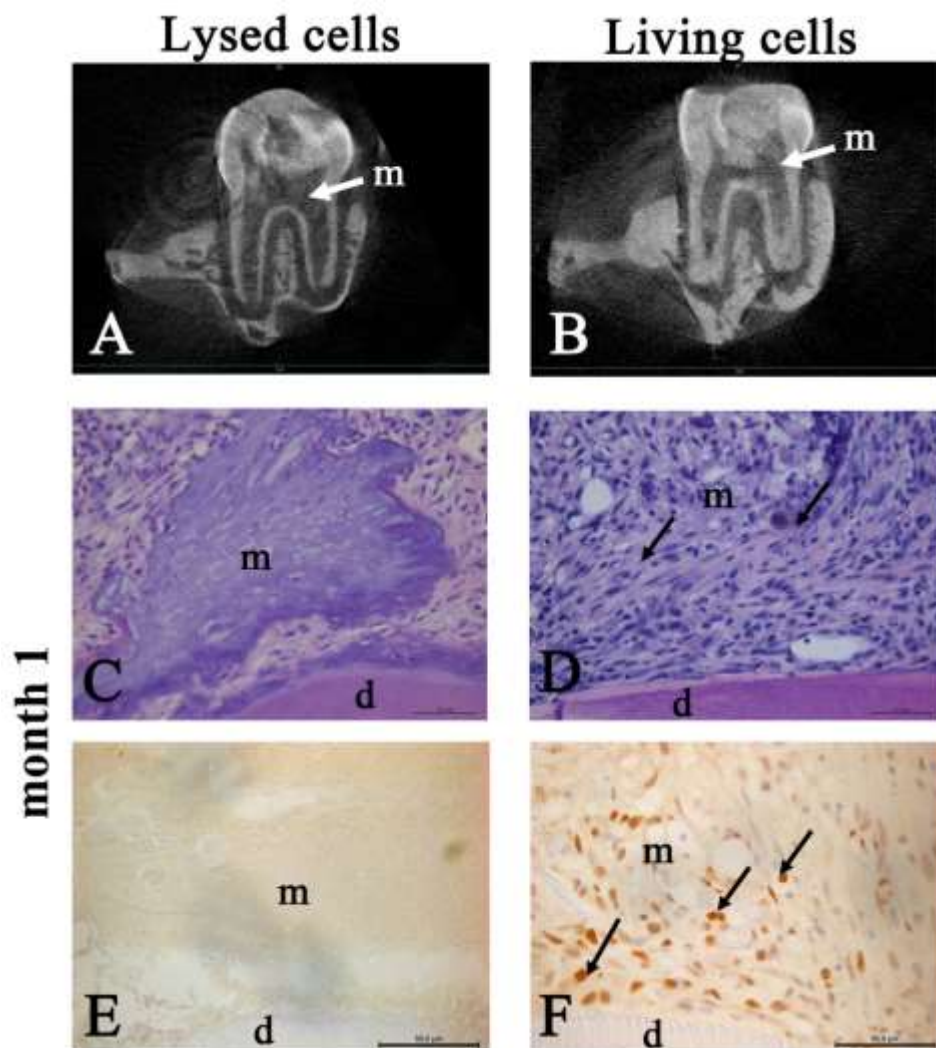


Figure 28 : Imagerie par micro-CT et coupes histologiques de matrices implantées

La coloration à l'hémalum éosine montre une matrice vide de cellules dans le cas des cellules lysées (C) contrairement à la matrice ensemencée de cellules vivantes (D). L'immunohistochimie de PCNA montre des cellules en prolifération dans cette même matrice (F).

Des structures vasculaires sont observées auprès des matrices ensemencées de cellules vivantes. Ces structures sont marquées par l'anticorps anti FvW. Autour des cellules ensemencées de cellules pulpaire lysées, ces structures vasculaires ne sont pas retrouvées (Figure 29).

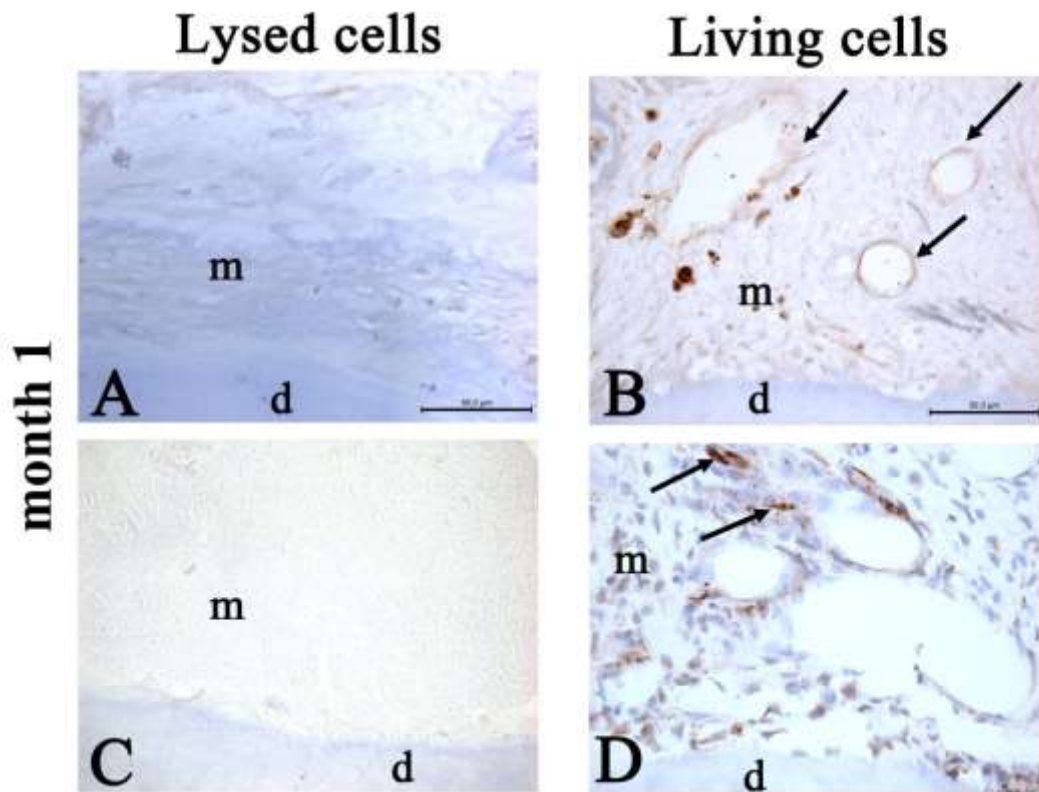


Figure 29 : Immunohistochimie des matrices implantées

L'immunohistochimie montre la mise en place de vaisseaux (anticorps anti FvW) et de fibres nerveuses (anticorps anti CGEP) à proximité des matrices cellularisées implantées (B et D), mais non dans les matrices ensemencées de cellules lysées (A et C).

L'immunohistochimie dirigé contre CGEP montre la présence d'une neurogenèse au contact de la zone d'implantation (Figure 29).

## 2. Analyse en $\mu$ CT

Des analyses histologiques et par  $\mu$ CT complémentaires sont nécessaires pour connaître la composition du tissu néoformé à long terme et notamment une apposition dentinaire éventuelle que nous n'avons pas mis en évidence histologiquement (Figure 30).

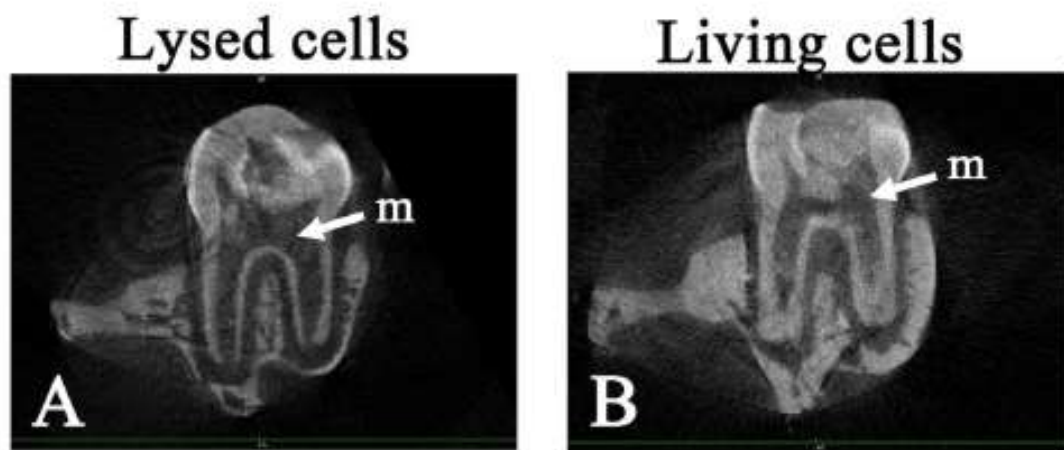


Figure 30 : Imagerie par micro CT des matrices implantées

Un mois après implantation, des cellules fibroblastiques vivants, en prolifération sont présentes dans les pulpes équivalentes. De plus, de nouveaux vaisseaux et des fibres nerveuses en formation sont visibles dans les matrices. Tandis que les lattis contrôles ensemencées avec des cellules lysées, sont dépourvus de colonisation cellulaire et d'éléments vasculaires et nerveux.

## **VI. Discussion**

Ce travail de doctorat nous a permis de franchir un premier jalon dans le projet de développement d'une thérapie cellulaire pour la régénération pulpaire. Ainsi, nous avons démontré la faisabilité de reformer un tissu conjonctif fonctionnel contenant des cellules prolifératives, une néovascularisation et néoinnervation dans le cadre de l'amputation partielle de la pulpe dentaire chez le rat.

A ce stade, il reste de nombreux points en suspens avant un potentiel transfert vers la clinique humaine.

## ***A. Protocole***

Même si notre protocole a évolué au cours des différentes manipulations, nous avons fait le choix d'un protocole proche de la clinique humaine, dans la perspective d'un transfert de cette thérapeutique chez l'homme.

### **- choix des cellules :**

Nous avons pris le parti de prendre une population totale de cellules pulpaire, sans tri cellulaire préalable. Dans notre démarche de mise au point du modèle, nous avons estimé qu'il était préférable d'initier les expérimentations avec une population pulpaire hétérogène. L'enrichissement en cellules progénitrices pourra se faire par la suite. Cependant, à ce jour, en dépit de recherches actives, aucun marqueur spécifique permettant une purification totale des progéniteurs de la pulpe n'a été trouvé. Des cellules souches de la pulpe ont été triées sur leur expression de marqueurs de surface comme STRO-1 ou CD34 ou sur leur capacité d'exclusion d'un colorant de liaison à l'ADN ou en fonction de leur taille (Gronthos, Brahimi et al. 2002; Iohara, Zheng et al. 2008). Les différents types de sous-populations de cellules obtenues pourraient conduire à différents potentiels de différenciation. Dans l'objectif de reconstruire une pulpe fonctionnelle, l'enrichissement sur une potentialité de différenciation odonto/ostéoblastique ne semble pas pertinent, car il pourrait conduire à une minéralisation de l'ensemble de la chambre pulpaire, ce qui n'est pas souhaitable. Par contre, nous pourrions envisager d'utiliser à l'avenir des DPSCs enrichies en cellules progénitrices présentant des propriétés angiogéniques ou de résistance à l'hypoxie accrues. Il a notamment été montré que les DPSCs CD31<sup>+</sup> / CD146<sup>+</sup> présentent un potentiel angiogénique très important dans l'ischémie cérébrale (Sugiyama, Iohara et al. 2011)).

- choix du biomatériau pour la culture 3D :

Il est évident que les interactions entre les cellules souches et de leur milieu sont essentielles, non seulement en terme de trafic cellulaire, de survie, de prolifération et de différenciation, mais également pour déterminer le potentiel de l'environnement sur la régénération des tissus. Ce biomatériau doit bien sûr être biocompatible et non toxique et avoir des caractéristiques physiques et mécaniques optimales (Landrigan, Flatley et al. 2010).

Dans le contexte de régénération de la pulpe dentaire, parmi les différents types de biomatériaux disponibles, notre choix s'est porté sur un matériau naturel, le collagène de type 1, car il permet de reproduire le microenvironnement de la pulpe (Nakashima, Reddi 2003; Iohara, Nakashima et al. 2004; Nakashima, Akamine 2005; Murray, Garcia-Godoy et al. 2007; Prescott, Alsanea et al. 2008; Ishimatsu, Kitamura et al. 2009; Kim, Xin et al. 2010). De plus il présente une excellente biocompatibilité (Hubbell 1995; Helary, Bataille et al. 2010). Par ailleurs, un hydrogel de collagène est biodégradable avec des produits de dégradation physiologiquement acceptables (Middelkoop, de Vries et al. 1995), ne nécessitant pas ainsi une nouvelle intervention en vue d'une ablation chirurgicale. De plus, il offre une porosité adéquate pour faciliter la pénétration des cellules et leur prolifération, pour permettre le transport des nutriments, de l'oxygène et de déchets métaboliques efficacement (Geiger, Li et al. 2003). Des travaux ont montré que les cellules dans ces matrices de collagène présentaient des divisions cellulaires régulées et que le processus de différenciation des progéniteurs / cellules souches était activé (Ortinou, Schmich et al. 2010; Estes, Guilak 2011). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de minéralisation de la chambre pulpaire, à laquelle on aurait pu s'attendre en implantant des cellules pouvant facilement subir un processus de différenciation odonto / ostéogénique. Cela confirme que l'utilisation d'une matrice lâche de collagène de type 1 est adaptée pour reconstruire la pulpe dentaire. Une alternative à ce matériau naturel, serait l'utilisation de polymères synthétiques, comme le PGA (acide polyglycolique), dont la biocompatibilité est moins bonne mais dont le taux de dégradation et les propriétés mécaniques sont plus contrôlables (Mooney, Powell et al. 1996; Bohl, Shon et al. 1998; Buurma, Gu et al. 1999; Vasita, Katti 2006; Vasita, Katti 2006). Il pourrait être judicieux d'utiliser de telles matrices, si nous ajoutons des peptides ou des molécules proangiogéniques aux pulpes équivalentes. Le taux de libération pourrait être ainsi plus contrôlable dans l'espace et dans le temps (Ferracane, Cooper et al. 2010).

## **B. Suivi et devenir des cellules implantées**

Une des problématiques liées à l'ingénierie tissulaire concerne le devenir des cellules implantées en préalable à une utilisation clinique potentielle. En effet, il est capital de déterminer si les cellules implantées restent dans la pulpe artificielle pour participer aux processus de régénération d'un tissu pulpaire vascularisé et innervé, ou bien si elles migrent *via* la circulation sanguine vers un autre tissu, ou encore si elles dégènèrent et sont éliminées par phagocytose.

Si les marquages cellulaires à la Green Fluorescent Protein (GFP) ou par la beta-galactosidase sont des techniques couramment décrites, elles sont inutilisables dans notre modèle dentaire en raison de la présence de tissus minéralisés. Pour l'implantation spécifique de la pulpe équivalente dans la chambre pulpaire, l'imagerie nucléaire et l'IRM sont les deux seules méthodes envisageables d'imagerie non invasives.

Nous avons choisi de faire le suivi *in vivo* des cellules par marquage par imagerie nucléaire. Le marquage des cellules pulpaires a été fait à l'Indium-oxine suivi d'une détection par scintigraphie monophotonique (SPECT). Cet isotope a été validé dans les marquages cellulaires dans des études précliniques (Aicher, Brenner et al. 2003). Il est couramment utilisé chez l'homme pour le radiomarquage des leucocytes dans le cadre de l'imagerie de l'infection (Thakur, Lavender et al. 1977; Thakur, Segal et al. 1977; Roca, de Vries et al. 2010). Il est bien établi pour surveiller des cellules implantées dans plusieurs modèles, y compris le traumatisme crânien aigu, l'ischémie cérébrale et l'infarctus. Un tel marquage radioactif permet de suivre la migration des cellules avec une grande sensibilité en utilisant la scintigraphie monophotonique (SPECT). En outre, le processus de marquage radioactif n'a pas modifié la viabilité ni la capacité de prolifération des cellules de la *pulpe in vitro*.

L'imagerie nucléaire offre une sensibilité élevée avec la possibilité de quantification du signal à des concentrations très faibles (de l'ordre de  $10^{-12}$  à  $10^{-15}$  mole /l), idéale pour le suivi cellulaire. De plus, cette technique permet d'obtenir des informations sur la biodistribution de cellules marquées dans tout le corps. Cela permet de vérifier qu'il n'y a pas d'accumulation de débris cellulaires dans les organes impliqués dans la clairance du sang (reins, foie et rate) ni dans les poumons en cas de diffusion veineuse. En outre, l'imagerie du corps entier permet la détection d'une diffusion possible des cellules implantées, ce qui,

dans le cas des DPSCs, pourrait conduire à des minéralisations ectopiques, un problème critique en ingénierie tissulaire.

Par contre, la radioactivité diminuant avec le temps, le suivi ne peut se faire que sur une période de temps limitée, et la manipulation des isotopes reste contraignante.

Dans l'avenir, l'utilisation de l'IRM, pourrait permettre un suivi à plus long terme des cellules implantées, avec toutefois une sensibilité inférieure à l'imagerie nucléaire. Pour l'IRM, le marquage des cellules est magnétique. Les agents de marquage de référence sont les nanoparticules supermagnétiques de fer (AMNP pour anionic superparamagnetic nanoparticles), utilisés pour de nombreux types cellulaires sans effet délétère (Bulte, Kraitman 2004; Poirier-Quinot, Frasca et al. 2010; Robert, Fayol et al. 2010; Brule, Levy et al. 2011). Pour nos expérimentations, le domaine de fréquence radio spécifique reste à développer.

Toutefois, quelle que soit la méthode d'imagerie utilisée, elle ne permet de répondre avec certitude à la question de l'origine des cellules prolifératives, retrouvées dans le lattis. Même si la quantité de signal SPECT est importante uniquement dans le cas des pulpes équivalentes avec des cellules intègres, ce qui suggère que les cellules implantées restaient viables, nous ne pouvons exclure la possibilité que les cellules en prolifération mises en évidence en histologie, soient des cellules de l'hôte recrutées. La preuve scientifique pourrait être apportée soit en implantant des cellules humaines chez des rats immunodéprimés ou grâce l'analyse FISH avec des sondes spécifiques donneurs/receveurs, qui toutes deux permettraient de distinguer les cellules implantées des cellules hôtes.

### ***C. Limites du modèle***

#### **- Inflammation**

Dans nos travaux, les cellules ont été implantées dans des dents saines, alors qu'en clinique, les cellules seraient implantées dans les dents présentant une inflammation générée par une infection bactérienne ou un traumatisme. Il serait pertinent dans l'avenir d'utiliser un modèle mimant l'inflammation pulpaire. La notion de réversibilité/irréversibilité, réalité de cliniciens mais non prouvée histologiquement et du diagnostic de cette inflammation se retrouverait alors au centre de ces recherches (Eba, Murasawa et al. 2012) proposent un



modèle chez le chien d'inflammation modérée et d'inflammation sévère induites en exposant au milieu buccal la pulpe respectivement pendant 24 et 72h avant coiffage.

- Evolution vers un modèle préclinique

Même en faisant évoluer le modèle chez le rat en tenant compte de paramètres cliniques, ce modèle animal présente des limites, notamment en termes d'échelle et d'anatomie. Il en résulte une restriction dans l'application des procédures cliniques et dans la pérennité des obturations, ce qui bien entendu limite le suivi dans le temps.

Nous envisageons donc de faire évoluer notre travail vers un autre modèle animal, à savoir le mini-porc. Le transfert vers un modèle animal non-rongeur permettrait en effet une réelle étape préclinique. En effet, cet omnivore présente une physiopathologie assez similaire à l'homme, notamment en terme de réponse pharmacologique, métabolique et anatomique. Ceci semble également vrai pour le système buccodentaire. Les porcs présentent par exemple un système de dentition comparable à l'homme, avec deux dentures. Il nous sera donc possible de cultiver des cellules pulpaire de dents temporaires, dont la faisabilité a déjà été prouvée. Afin de faire la preuve du concept, bien qu'il soit rapporté des greffes de cellules, de mini-cochons consanguins, nous envisageons de rester, comme chez l'homme, dans un système de greffe autologue. Les pulpes équivalentes seraient donc préparées de manière similaire avant implantation dans les prémolaires et molaires après pulpotomie.

#### ***D. Transfert vers la clinique humaine***

Il est désormais établi que la dent est une source de cellules souches mésenchymateuses à exploiter pour la dentisterie régénérative. Une pulpe saine peut être facilement recueillie après la chute de dents temporaire ou leur extraction, ainsi que l'extraction de prémolaires ou troisièmes molaires réalisée dans le cadre d'un traitement orthodontique. La question de la préservation de ces cellules en vue d'une potentielle utilisation quelques dizaines d'années après, n'est pas résolue. En France, il est probable que l'utilisation thérapeutique des cellules souches pulpaire de l'homme sera développée à travers la mise en place de biobanques de cellules gérées par les hôpitaux universitaires ou d'autres organismes nationaux. Comme toutes les cellules souches, celles de la pulpe ont des propriétés immunomodulatrices, il pourrait donc être envisageable de les utiliser en allogreffe. Dans ce

cas, le choix d'utiliser des cellules souches autologues ou hétérologues dépendra de la position des comités d'éthique et des choix gouvernementaux.

Dans son déroulement, le passage à l'homme doit être raisonné et faire l'objet des demandes réglementaires auprès de l'AFSSAPS et du Comité de protection des personnes selon la législation en vigueur à ce jour. Ce transfert vers la clinique humaine exige un temps d'évaluation. Il doit porter sur des aspects qui ne sont pas uniquement techniques, physiologiques et chirurgicaux, mais également psychologiques, incluant les conditions éthiques de réalisation. C'est une nécessité scientifique compte tenu des retombées pour les patients qui se justifie pleinement lorsqu'elle améliore significativement la qualité de vie des malades qui en bénéficient.

## **VII. Conclusion**

Ce travail constituait une première étape en vue d'une thérapie permettant de régénérer la pulpe à la place du traitement endodontique.

Nos résultats ont d'abord montré la faisabilité de la « pulpe équivalente » *in vitro*. La biocompatibilité a ensuite été évaluée en implantation ectopique, la bonne intégration de ces matrices les rendant difficiles à localiser.

L'étape suivante, à savoir l'implantation dans la dent a nécessité la mise au point et la validation du modèle de pulpotomie chez le rat. L'utilisation de la technique de marquage à l'oxyne-Indium sur les cellules pulpaire a ensuite permis l'implantation de cette « pulpe équivalente » et le suivi par SPECT/CT, CT des cellules implantées *in vivo*. En parallèle, l'emploi des techniques classiques d'histologie ont permis de démontrer la survie cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse et une néo-innervation. L'absence de migration des cellules implantées hors de la zone d'implantation est l'un des points importants de cette technique de régénération pulpaire.

Les résultats obtenus lors de ces travaux permettent d'imaginer à terme la transposition d'une technique de régénération pulpaire chez l'homme. Cependant, de nombreuses questions se présentent quant à la nature et la fonctionnalité du tissu ainsi que son comportement à long terme. L'amélioration de la « pulpe équivalente » par la sélection de cellules, l'utilisation de facteurs de croissance ou d'autres agents et la compréhension des réactions inflammatoires après la mise en place de la « pulpe équivalente » sont les enjeux de la réussite de ce type de traitement. La poursuite du projet au sein du laboratoire chez un animal plus proche de l'homme, le mini-porc ; sera extrêmement intéressante et à mettre en parallèle avec les évolutions des techniques de revascularisation.

## **VIII. Bibliographie**

- Aicher, A., W. Brenner, et al. (2003). "Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling." Circulation **107**(16): 2134-2139.
- Andreasen, J. O. and L. K. Bakland (2012). "Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review." Dent Traumatol **28**(1): 13-18.
- Arthur, A., G. Rychkov, et al. (2008). "Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues." Stem Cells **26**(7): 1787-1795.
- Bashutski, J. D. and H. L. Wang (2009). "Periodontal and endodontic regeneration." J Endod **35**(3): 321-328.
- Batouli, S., M. Miura, et al. (2003). "Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis." J Dent Res **82**(12): 976-981.
- Bell, E., B. Ivarsson, et al. (1979). "Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1274-1278.
- Bender, I. B., S. Seltzer, et al. (2003). "The incidence of bacteremia in endodontic manipulation: preliminary report. 1960." J Endod **29**(11): 697-700; discussion 696.
- Bletsa, A., I. Fristad, et al. (2009). "Sensory pulpal nerve fibres and trigeminal ganglion neurons express IL-1RI: a potential mechanism for development of inflammatory hyperalgesia." Int Endod J **42**(11): 978-986.
- Bogovic, A., J. Nizetic, et al. (2011). "The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts." Arh Hig Rada Toksikol **62**(2): 155-161.
- Bohl, K. S., J. Shon, et al. (1998). "Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp." J Biomater Sci Polym Ed **9**(7): 749-764.
- Brule, S., M. Levy, et al. (2011). "Doxorubicin release triggered by alginate embedded magnetic nanoheaters: a combined therapy." Adv Mater **23**(6): 787-790.
- Buckley, M. and L. S. Spangberg (1995). "The prevalence and technical quality of endodontic treatment in an American subpopulation." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **79**(1): 92-100.
- Bulte, J. W. and D. L. Kraitchman (2004). "Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging." NMR Biomed **17**(7): 484-499.
- Buurma, B., K. Gu, et al. (1999). "Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds." Eur J Oral Sci **107**(4): 282-289.
- Caviedes-Bucheli, J., H. R. Munoz, et al. (2008). "Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists." J Endod **34**(7): 773-788.
- Chaussain Miller, C., D. Septier, et al. (2002). "Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling." Clin Oral Investig **6**(1): 39-50.
- Cooper, P. R., Y. Takahashi, et al. (2010). "Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex." J Dent **38**(9): 687-697.
- Coulomb, B., L. Friteau, et al. (1998). "Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans." Plast Reconstr Surg **101**(7): 1891-1903.
- d'Aquino, R., A. Graziano, et al. (2007). "Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation." Cell Death Differ **14**(6): 1162-1171.
- de Almeida, F. M., S. A. Marques, et al. (2011). "Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury." J Neurotrauma **28**(9): 1939-1949.
- Decup, F., N. Six, et al. (2000). "Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar." Clin Oral Investig **4**(2): 110-119.
- Eba, H., Y. Murasawa, et al. (2012). "The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth." PLoS One **7**(12): e52523.

- Eleuterio, E., O. Trubiani, et al. (2013). "Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp." PLoS One **8**(8): e71101.
- Estes, B. T. and F. Guilak (2011). "Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells." Methods Mol Biol **702**: 201-217.
- Fadavi, S. and A. W. Anderson (1996). "A comparison of the pulpal response to freeze-dried bone, calcium hydroxide, and zinc oxide-eugenol in primary teeth in two cynomolgus monkeys." Pediatr Dent **18**(1): 52-56.
- Fang, C. Z., Y. J. Yang, et al. (2013). "Intraventricular injection of human dental pulp stem cells improves hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats." PLoS One **8**(6): e66748.
- Farges, J. C., J. F. Keller, et al. (2009). "Odontoblasts in the dental pulp immune response." J Exp Zool B Mol Dev Evol **312B**(5): 425-436.
- Farges, J. C., A. Romeas, et al. (2003). "TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer." J Dent Res **82**(8): 652-656.
- Ferracane, J. L., P. R. Cooper, et al. (2010). "Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration?" Odontology **98**(1): 2-14.
- Fiers, W., R. Beyaert, et al. (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." Oncogene **18**(54): 7719-7730.
- Friedman, S., S. Abitbol, et al. (2003). "Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study. Phase 1: initial treatment." J Endod **29**(12): 787-793.
- Gandia, C., A. Arminan, et al. (2008). "Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction." Stem Cells **26**(3): 638-645.
- Geiger, M., R. H. Li, et al. (2003). "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2." Adv Drug Deliv Rev **55**(12): 1613-1629.
- Gerli, R., I. Secciani, et al. (2010). "Absence of lymphatic vessels in human dental pulp: a morphological study." Eur J Oral Sci **118**(2): 110-117.
- Goldberg, M. (2008). "Histologie du complexe dentino-pulpaire." Encyclopédie Médico Chirurgicale.
- Goldberg, M. (2011). "Pulp healing and regeneration: more questions than answers." Adv Dent Res **23**(3): 270-274.
- Goldberg, M., J. C. Farges, et al. (2008). "Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair." Pharmacol Res **58**(2): 137-147.
- Goldberg, M., N. Six, et al. (2009). "Dentin extracellular matrix molecules implanted into exposed pulps generate reparative dentin: a novel strategy in regenerative dentistry." J Dent Res **88**(5): 396-399.
- Goldberg, M. and A. J. Smith (2004). "Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering." Crit Rev Oral Biol Med **15**(1): 13-27.
- Graziano, A., R. d'Aquino, et al. (2007). "Concave pit-containing scaffold surfaces improve stem cell-derived osteoblast performance and lead to significant bone tissue formation." PLoS One **2**(6): e496.
- Gronthos, S., A. Arthur, et al. (2011). "A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells." Methods Mol Biol **698**: 107-121.
- Gronthos, S., J. Brahimi, et al. (2002). "Stem cell properties of human dental pulp stem cells." J Dent Res **81**(8): 531-535.
- Gronthos, S., M. Mankani, et al. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13625-13630.
- Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cell Signal **13**(2): 85-94.
- Helary, C., I. Bataille, et al. (2010). "Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes." Biomaterials **31**(3): 481-490.
- Huang, G. T. (2008). "A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration." J Dent **36**(6): 379-386.

- Huang, G. T. (2009). "Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress." Regen Med **4**(5): 697-707.
- Huang, G. T., S. Gronthos, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine." J Dent Res **88**(9): 792-806.
- Huang, G. T., T. Yamaza, et al. (2010). "Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model." Tissue Eng Part A **16**(2): 605-615.
- Hubbell, J. A. (1995). "Biomaterials in tissue engineering." Biotechnology (N Y) **13**(6): 565-576.
- I, D. A., E. Nargi, et al. (2011). "Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells." J Biol Regul Homeost Agents **25**(1): 57-69.
- Iohara, K., M. Murakami, et al. (2013). "A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration." Stem Cells Transl Med **2**(7): 521-533.
- Iohara, K., M. Nakashima, et al. (2004). "Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2." J Dent Res **83**(8): 590-595.
- Iohara, K., L. Zheng, et al. (2006). "Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis." Stem Cells **24**(11): 2493-2503.
- Iohara, K., L. Zheng, et al. (2008). "A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp." Stem Cells **26**(9): 2408-2418.
- Ishimatsu, H., C. Kitamura, et al. (2009). "Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels." J Endod **35**(6): 858-865.
- Jegat, N., D. Septier, et al. (2007). "Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp." Head Face Med **3**: 40.
- Jo, Y. Y., H. J. Lee, et al. (2007). "Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues." Tissue Eng **13**(4): 767-773.
- Jontell, M., T. Okiji, et al. (1998). "Immune defense mechanisms of the dental pulp." Crit Rev Oral Biol Med **9**(2): 179-200.
- Kawashima, N. (2012). "Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?" Arch Oral Biol **57**(11): 1439-1458.
- Kerkis, I., C. E. Ambrosio, et al. (2008). "Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?" J Transl Med **6**: 35.
- Kerkis, I. and A. I. Caplan (2012). "Stem cells in dental pulp of deciduous teeth." Tissue Eng Part B Rev **18**(2): 129-138.
- Kim, B. C., H. Bae, et al. (2012). "Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine." Tissue Eng Part B Rev **18**(3): 235-244.
- Kim, J. Y., X. Xin, et al. (2010). "Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing." Tissue Eng Part A **16**(10): 3023-3031.
- Kiraly, M., K. Kadar, et al. (2011). "Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo." Neurochem Int **59**(3): 371-381.
- Kokkas, A., A. Goulas, et al. (2011). "The role of cytokines in pulp inflammation." J Biol Regul Homeost Agents **25**(3): 303-311.
- Koyama, N., Y. Okubo, et al. (2009). "Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells." J Oral Maxillofac Surg **67**(3): 501-506.
- Lacerda-Pinheiro, S., N. Jegat, et al. (2006). "Early in vivo and in vitro effects of amelogenin gene splice products on pulp cells." Eur J Oral Sci **114** Suppl 1: 232-238; discussion 254-236, 381-232.



- Landrigan, M. D., J. C. Flatley, et al. (2010). "Detection of dentinal cracks using contrast-enhanced micro-computed tomography." J Mech Behav Biomed Mater **3**(2): 223-227.
- Maeda, T., T. Iwanaga, et al. (1987). "Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium." Cell Tissue Res **249**(1): 13-23.
- Magloire, H., M. L. Couble, et al. (2004). "Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses." Cell Biol Int **28**(2): 93-99.
- Magloire, H., M. L. Couble, et al. (2009). "Odontoblast: a mechano-sensory cell." J Exp Zool B Mol Dev Evol **312B**(5): 416-424.
- Magloire, H., J. C. Maurin, et al. (2010). "Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses." J Orofac Pain **24**(4): 335-349.
- Manuja, N., R. Nagpal, et al. (2010). "Dental pulp neuropathophysiology." J Clin Pediatr Dent **35**(2): 121-127.
- Marchetti, C., P. Poggi, et al. (1992). "Lymphatic vessels of the human dental pulp in different conditions." Anat Rec **234**(1): 27-33.
- Martin, A., H. Gasse, et al. (2010). "Absence of lymphatic vessels in the dog dental pulp: an immunohistochemical study." J Anat **217**(5): 609-615.
- Masthan, K. M., S. L. Sankari, et al. (2013). "Mystery inside the tooth: the dental pulp stem cells." J Clin Diagn Res **7**(5): 945-947.
- Mathieu, S., A. El-Battari, et al. (2005). "Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells." Arch Oral Biol **50**(2): 109-113.
- Maurin, J. C., M. L. Couble, et al. (2013). "[Odontoblast: a key cell involved in the perception of dentinal pain]." Med Sci (Paris) **29**(3): 293-299.
- Middelkoop, E., H. J. de Vries, et al. (1995). "Adherence, proliferation and collagen turnover by human fibroblasts seeded into different types of collagen sponges." Cell Tissue Res **280**(2): 447-453.
- Mjor, I. A. (2002). "Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp." Quintessence Int **33**(2): 113-135.
- Mjor, I. A., O. B. Sveen, et al. (2001). "Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology." Quintessence Int **32**(6): 427-446.
- Mohamadreza, B. E., A. Khorsand, et al. (2012). "Autologous Dental Pulp Stem Cells in Regeneration of Defect Created in Canine Periodontal Tissue." J Oral Implantol.
- Mooney, D. J., C. Powell, et al. (1996). "Engineering dental pulp-like tissue in vitro." Biotechnol Prog **12**(6): 865-868.
- Murray, P. E., I. About, et al. (2003). "Odontoblast morphology and dental repair." J Dent **31**(1): 75-82.
- Murray, P. E., F. Garcia-Godoy, et al. (2007). "Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action." J Endod **33**(4): 377-390.
- Murray, P. E., L. J. Windsor, et al. (2002). "Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies." Crit Rev Oral Biol Med **13**(6): 509-520.
- Nakashima, M. and A. Akamine (2005). "The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics." J Endod **31**(10): 711-718.
- Nakashima, M. and A. H. Reddi (2003). "The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering." Nat Biotechnol **21**(9): 1025-1032.
- Neha, K., R. Kansal, et al. (2011). "Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **16**(7): e997-1004.
- Nosrat, A., A. Seifi, et al. (2011). "Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial." J Endod **37**(4): 562-567.
- Onyekwelu, O., M. Seppala, et al. (2007). "Tooth development: 2. Regenerating teeth in the laboratory." Dent Update **34**(1): 20-22, 25-26, 29.
- Ortinou, S., J. Schmich, et al. (2010). "Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells." Biomed Eng Online **9**: 70.

- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, et al. (2007). "Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions." Blood **109**(4): 1422-1432.
- Piette, G. (2001). La dent normale et pathologique, De Boeck Université.
- Poirier-Quinot, M., G. Frasca, et al. (2010). "High-resolution 1.5-Tesla magnetic resonance imaging for tissue-engineered constructs: a noninvasive tool to assess three-dimensional scaffold architecture and cell seeding." Tissue Eng Part C Methods **16**(2): 185-200.
- Prescott, R. S., R. Alsanea, et al. (2008). "In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice." J Endod **34**(4): 421-426.
- Rai, S., M. Kaur, et al. (2012). "Redefining the potential applications of dental stem cells: An asset for future." Indian J Hum Genet **18**(3): 276-284.
- Reing, J. E., L. Zhang, et al. (2009). "Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation." Tissue Eng Part A **15**(3): 605-614.
- Robert, D., D. Fayol, et al. (2010). "Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells." Biomaterials **31**(7): 1586-1595.
- Robinson, J. P., P. J. Lumley, et al. (2012). "An analytical Micro CT methodology for quantifying inorganic dentine debris following internal tooth preparation." J Dent **40**(11): 999-1005.
- Roca, M., E. F. de Vries, et al. (2010). "Guidelines for the labelling of leucocytes with (111)In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine." Eur J Nucl Med Mol Imaging **37**(4): 835-841.
- Rodriguez-Lozano, F. J., C. L. Insausti, et al. (2012). "Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **17**(6): e1062-1067.
- Ruch, J. V., H. Lesot, et al. (1995). "Odontoblast differentiation." Int J Dev Biol **39**(1): 51-68.
- Sawa, Y., S. Yoshida, et al. (1998). "Immunohistochemical demonstration of lymphatic vessels in human dental pulp." Tissue Cell **30**(5): 510-516.
- Scheller, E. L., P. H. Krebsbach, et al. (2009). "Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation." J Oral Rehabil **36**(5): 368-389.
- Seong, J. M., B. C. Kim, et al. (2010). "Stem cells in bone tissue engineering." Biomed Mater **5**(6): 062001.
- Simon, S. R., A. Berdal, et al. (2011). "Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic." Adv Dent Res **23**(3): 340-345.
- Six, N., D. Septier, et al. (2007). "Dentonin, a MEPE fragment, initiates pulp-healing response to injury." J Dent Res **86**(8): 780-785.
- Sloan, A. J. and A. J. Smith (2007). "Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair." Oral Dis **13**(2): 151-157.
- Smith, A. J., N. Cassidy, et al. (1995). "Reactionary dentinogenesis." Int J Dev Biol **39**(1): 273-280.
- Sugiyama, M., K. Iohara, et al. (2011). "Dental pulp-derived CD31(-)/CD146(-) side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats." Tissue Eng Part A **17**(9-10): 1303-1311.
- Sun, H. H., T. Jin, et al. (2011). "Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering." J Tissue Eng Regen Med **5**(4): e1-16.
- Thakur, M. L., J. P. Lavender, et al. (1977). "Indium-111-labeled autologous leukocytes in man." J Nucl Med **18**(10): 1014-1021.
- Thakur, M. L., A. W. Segal, et al. (1977). "Indium-111-labeled cellular blood components: mechanism of labeling and intracellular location in human neutrophils." J Nucl Med **18**(10): 1022-1026.
- Tirino, V., F. Paino, et al. (2012). "Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells." Methods Mol Biol **879**: 443-463.
- Toda, N., K. Ayajiki, et al. (2012). "Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues." J Cardiovasc Pharmacol **60**(1): 100-108.
- Tran, X. V., C. Gorin, et al. (2012). "Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair." J Dent Res **91**(12): 1166-1171.

- Trubiani, O., D. Tripodi, et al. (2003). "Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement." J Dent Res **82**(9): 742-747.
- Tziafas, D. (2004). "The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration." Caries Res **38**(3): 314-320.
- Vasita, R. and D. S. Katti (2006). "Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective." Expert Rev Med Devices **3**(1): 29-47.
- Vasita, R. and D. S. Katti (2006). "Nanofibers and their applications in tissue engineering." Int J Nanomedicine **1**(1): 15-30.
- Veerayutthwilai, O., M. R. Byers, et al. (2007). "Differential regulation of immune responses by odontoblasts." Oral Microbiol Immunol **22**(1): 5-13.
- Ward, J. (2002). "Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations." Aust Endod J **28**(1): 29-37.
- Yu, J., Z. Deng, et al. (2006). "Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium." Tissue Eng **12**(11): 3097-3105.
- Zhang, J., N. Kawashima, et al. (2006). "The existence of CD11c+ sentinel and F4/80+ interstitial dendritic cells in dental pulp and their dynamics and functional properties." Int Immunol **18**(9): 1375-1384.

## **IX. Liste des publications et communications :**

### Publications

#### **Pulp Cell Tracking by Radionuclide Imaging for Dental Tissue Engineering.**

Souron JB, Petiet A, Decup F, Tran XV, Lesieur J, Poliard A, Le Guludec D, Letourneur D, Chaussain C, Rouzet F, Opsahl Vital S.  
Tissue Eng Part C Methods. 2013

#### **Multiple effects of the cellular prion protein on tooth development.**

Zhang Y, Kim SO, Opsahl-Vital S, Ho SP, Souron JB, Kim C, Giles K, Den Besten PK.  
Int J Dev Biol. 2011

### Communications

**Conseuro**, Paris, mai 2012, poster, 1<sup>er</sup> prix Recherche

Titre « Pulp Cell tracking by Nuclear Imaging for tissue engineering »

**IADR**, Helsinki, Finlande, septembre 2012, oral session

Titre « Pulp bioengineering: tracking of implanted stem cells by nuclear imaging »

**CNEOC**, Strasbourg, octobre 2012, oral session

Titre « Régénération de la pulpe dentaire : suivi de cellules pulpaire implantées par imagerie nucléaire »

**EAPD**, Strasbourg 2012, oral session

Titre « Bioengineering for the injured pulp: tracking of implanted stem cells by nuclear imaging »

**ICCBMT**, Scottsdale Arizona, USA, septembre 2010, poster

Titre « The role of Prion protein in dentinogenesis »

**Congrès de l'ADF**, Paris, novembre 2010, conférence

Titre « Le traitement chimique de la carie : mythe de l'industrie ou réalité pour nos patients ? »

**CNEPO**, Reims, septembre 2010, poster, 3ème prix de recherche

Titre « Rôle de la protein Prion dans l'odontogenèse »

**IADR**, Munich, septembre 2009, poster, sélectionné pour le prix Robert Franck

Titre « The role of Prion protein in dentinogenesis »

## **X. Annexe I**

## Multiple effects of the cellular prion protein on tooth development

YAN ZHANG<sup>1,\*</sup>, SEONG-OH KIM<sup>1,2,\*</sup>, SIBYLLE OPSAHL-VITAL<sup>1,3</sup>, SUNITA P. HO<sup>4</sup>,  
JEAN-BAPTISTE SOURON<sup>5</sup>, CHARLES KIM<sup>1</sup>, KURT GILES<sup>3,6</sup> and PAMELA K. DEN BESTEN<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orofacial Sciences, University of California San Francisco, USA, <sup>2</sup>Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea, <sup>3</sup>University Paris Descartes, EA2496, AP-HP, France, <sup>4</sup>Division of Biomaterials and Bioengineering, Department of Preventive and Restorative Dental Sciences, <sup>5</sup>Institute for Neurodegenerative Diseases and <sup>6</sup>Department of Neurology, University of California San Francisco, USA.

**ABSTRACT** The role of the prion protein (PrP) in transmissible spongiform encephalopathies has been the focus of intense investigation. However, less is known about the physiological function of normal cellular PrP (PrP<sup>C</sup>). In adult human teeth, PrP<sup>C</sup> has been identified in odontoblasts, cementoblasts and epithelial remnants of Malassez. In this study, we have localized PrP<sup>C</sup> in developing human and mouse teeth, and investigated the function of PrP using a PrP-knockout (*Pmp<sup>0/0</sup>*) mouse model. PrP<sup>C</sup> was detected in developing human and mouse ameloblasts and odontoblasts. *In vitro*, undifferentiated dental mesenchymal cells from embryonic day 18 (E18) *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse molars proliferated much more rapidly compared to age-matched, wild-type (wt) mouse molar dental mesenchymal cells. Histochemistry and immunohistochemical analyses showed a subtle but measurable phenotype, with the absence of PrP resulting in earlier initiation of both dentin and enamel formation. Consistent with this finding, laser microdissected odontoblasts from newborn *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse incisors had a reduced proliferation rate, as measured by the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and increased type 1 collagen mRNA expression. Dentin microhardness of the fully erupted molars was reduced and incisal enamel mineralization was delayed in *Pmp<sup>0/0</sup>* compared to age-matched wt mouse teeth. Taken together, these results suggest that PrP<sup>C</sup> affects multiple processes involved in tooth formation, through regulating the differentiation of ameloblasts and odontoblasts.

**KEY WORDS:** tooth development, prion protein, ameloblast, odontoblast

### Introduction

The prion protein (PrP) is a glycoprotein anchored to the cell membrane. It is highly conserved among mammals and is also present in birds, reptiles and amphibians (Premji and Gamulin 2007), suggesting an important functional role. Normal cellular PrP, termed PrP<sup>C</sup>, is widely expressed in adult tissues, predominantly in neuronal cells, and its expression is regulated both embryonically (Manson *et al.*, 1992; Tremblay *et al.*, 2007) and postnatally (Lazarini *et al.*, 1991; McKinley *et al.*, 1987). However, mice in which PrP expression has been genetically abrogated are not only viable, but appear to have only subtle phenotypes (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994a).

Expression of PrP<sup>C</sup> was detected in inner and outer epithelial layers of the E16.5 mouse tooth primordium by *in situ* hybridization

(Manson *et al.*, 1992), and in the dental papilla and ameloblasts of E18.5 mice by immunohistochemistry (Khan *et al.*, 2010). PrP<sup>C</sup> was also detected in odontoblasts, cementoblasts and epithelial remnants of Malassez in adult human dental tissues by immunohistochemistry (Schneider *et al.*, 2007). These cells are all involved in the formation of mineralization tissues. In mice infected with the Me7 prion strain, the pathological isoform of the prion protein, PrP<sup>Sc</sup>, was observed in the rests of Malassez lining the tooth surface (Okada *et al.*, 2010).

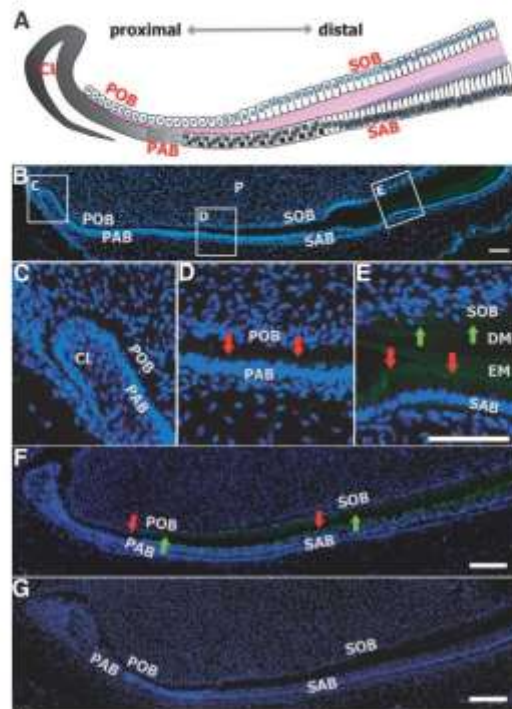
Teeth form through sequential reciprocal signaling interactions between ectodermal-derived dental epithelial cells and cranial neurocrest differentiated mesenchymal cells (Sharpe 2001, Thesleff

*Abbreviations used in this paper:* DMC, dental mesenchymal cell; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PrP, prion protein; PrP<sup>C</sup>, normal cellular prion protein.

\*Address correspondence to: Pamela DenBesten, 513 Parnassus Ave, San Francisco, CA 94143-0422, USA. Tel: +1-415-502-6383. Fax: +1-415-476-4204. e-mail: pameladenbesten@ucsf.edu # Note These authors contributed equally to this work.

Accepted: 3 August 2011. Final, author-corrected PDF published online: 30 September 2011.

ISSN: Online 1696-3547, Print 0214-6282  
© 2011 IBC Press  
Printed in Spain



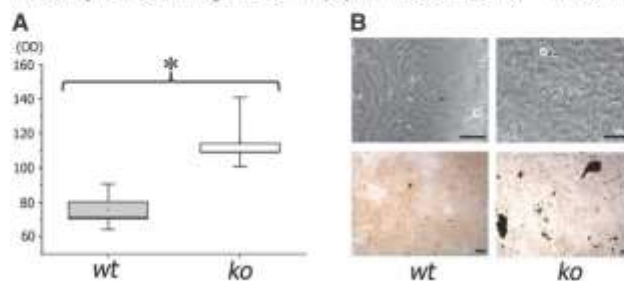
**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of PrP in human fetal (B-E) and mouse (F,G) tooth organs. (A) The diagram illustrates the dynamic development of dental mesenchymal cells and dental epithelial cells during incisor morphogenesis. The dental mesenchymal cells adjacent to epithelial cells develop into polarized pre-odontoblasts (POBs) first, then continuously develop into secretory odontoblasts (SOBs), which secrete dentin matrix and are responsible for the dentin formation. The dental epithelial precursor cells located in the cervical loop (CL) migrate to the basal layer around the outside of the loop. The basal epithelial cells polarize and elongate to become pre-ameloblasts (PABs), then differentiate into secretory ameloblasts (SABs), which secrete enamel matrix proteins and attract minerals to initiate enamel biomineralization. (B) Staining of human developing incisor tooth organ showed significant upregulation of PrP (green staining) as the cells entered the secretory stage. (C) Higher magnification of the cervical loop (CL) area showed no PrP signal was detected. (D) Gradually increased PrP staining was detected first in pre-ameloblasts (PAB; red arrows). (E) PrP signal was observed in the fully differentiated secretory ameloblasts (SAB; red arrows), and secretory odontoblasts (SOB; green arrows). (F) In the mouse incisor, immunopositive PrP signal first appeared in pre-odontoblasts (POB; green arrows). The signals became more intense as the cells differentiated into SOB (green arrows) and SAB (red arrows). (G)  $Pmp^{+/+}$  mouse incisors were immunonegative for PrP. All the blue stain is the counterstaining of nuclei with Hoechst 33324. Bars = 100  $\mu$ m, bar in E applies to C and D. Pre-odontoblasts (POB), pre-ameloblasts (PAB), secretory odontoblasts (SOB), secretory ameloblasts (SAB), dental pulp (P), cervical loop (CL), dentin matrix (DM), enamel matrix (EM).

and Nieminen 1996). Tooth formation initiates as the oral epithelial cells, lining upper and lower jaws in the first arch at the presumptive tooth sites, proliferate and thicken to form primary epithelial bands (also named dental placode). Proliferating epithelial cells invaginate into the underlying dental mesenchyme. In response to signals from the dental epithelium, the dental mesenchyme condenses and forms a bud structure (Bei and Maas 1998, Mandler and Neubuser 2001, Neubuser et al., 1997). The epithelium then forms a cap-like structure overlying the dental mesenchyme.

Individual tissues in the tooth continue to differentiate during the subsequent bell stage (mouse E16 to postnatal days). As cusp morphogenesis continues, cytodifferentiation begins and mesenchymal cells lining the dental papilla differentiate into

columnar odontoblasts. As long as the odontoblasts begin to secrete dentin matrix, the adjacent pre-ameloblasts differentiate into ameloblasts (Harada et al., 1999). Enamel mineralization begins as soon as secretory ameloblasts secrete amelogenins and other non-amelogenin proteins, all of which self-assemble to form a mineralizing enamel matrix on the dentin surface. At the transition between secretion and maturation stages, matrix proteins are rapidly removed by matrix proteinases leaving a porous enamel matrix. This matrix is subsequently completely mineralized as maturation stage ameloblasts modulate between smooth and ruffle bordered cells. At the end of enamel maturation, ameloblasts undergo apoptosis and finally disappear as the tooth erupts (Vahtokari et al., 1996).

In this study, we first localized PrP<sup>C</sup> in human developing incisors and mouse teeth at various developmental stages, then further investigated the role of PrP<sup>C</sup> on tooth development by using mouse tooth models. Mouse molars are rooted teeth similar to human teeth, while mouse incisors are continuously growing, allowing studies of all stages of tooth formation in a single tooth. PrP-knockout ( $ko$ ;  $Pmp^{0/0}$ ) mice and wild-type ( $wt$ ) mice were used to investigate the physiological function of PrP in tooth development. Cell proliferation and differentiation was



**Fig. 2.** The effect of PrP on undifferentiated dental mesenchymal cells (DMCs) isolated from E18 mouse molars. (A) DMCs from  $Pmp^{+/ko}$  mice proliferated faster, as indicated by the significantly increased optical density (OD) compared to cells isolated from  $wt$  mice ( $*p < 0.05$ ,  $n = 4$ ; Student's  $t$ -test) based on the BrdU cell proliferation assay. (B) The top panels showed that DMCs from  $Pmp^{+/ko}$  mice plated at the same density as  $wt$  cells, were more confluent after 5 days in culture (Bars = 10  $\mu$ m). The lower panels showed von Kossa staining of DMCs grown for 2 wks in mineralizing media, and demonstrated the increased mineralization of DMCs isolated from  $Pmp^{+/ko}$  compared to  $wt$  mice (Bars = 100  $\mu$ m). Representative results from three independent experiments.



compared in developing dental mesenchymal cells isolated from E18 wt and ko mice, as well as in differentiated pre-odontoblasts and secretory odontoblasts microdissected from newborn wt and ko mice. The progressive formation of dentin and enamel were investigated in newborn mouse incisors, and microhardness was measured in fully formed first mouse molars.

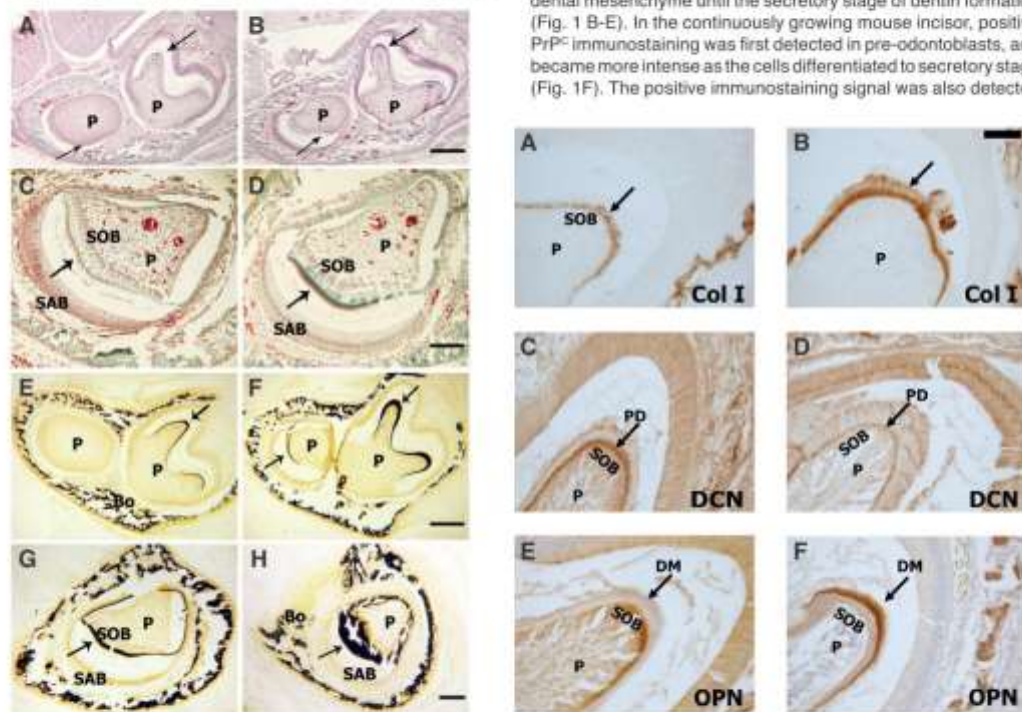
The results of this study showed that PrP<sup>C</sup> had the specific effects on different stages of tooth cell differentiation and matrix mineralization. The primary phenotypes in *Pmp<sup>0/0</sup>* mice included enhanced pulp mesenchymal cell proliferation and mature dentin with a reduced hardness. Enamel mineralization was initiated

earlier, followed by a subsequent delay in final mineralization. These effects suggest that PrP<sup>C</sup> may be involved in mediating differentiation of the cells responsible for tooth hard tissue formation.

## Results

### Prion protein (PrP) was localized in both odontoblasts and ameloblasts of developing teeth

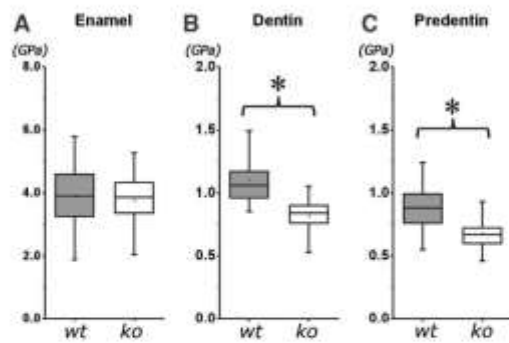
In developing human teeth, immunohistochemical analysis showed PrP<sup>C</sup> localized at the apical border of pre-ameloblasts and secretory ameloblasts, but not apparent in the developing dental mesenchyme until the secretory stage of dentin formation (Fig. 1 B-E). In the continuously growing mouse incisor, positive PrP<sup>C</sup> immunostaining was first detected in pre-odontoblasts, and became more intense as the cells differentiated to secretory stage (Fig. 1 F). The positive immunostaining signal was also detected



**Fig. 3 (Left).** Histological comparisons of newborn wt (A,C,E,G) and *Pmp<sup>0/0</sup>* (B,D,F,H) mouse mandibles. Newborn mouse mandibles were collected, fixed, embedded, and cut into 7µm-thick transversal sections. Sections at the same distance from the incisal tip were examined and compared. H&E staining of the wt mouse mandibles (A) showed dentin (green; indicated by arrow) but no enamel matrix formation was visible in molar, and no dentin or enamel formation was detected on the underlying cross section of the incisor (indicated by arrow). However, in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse (B) enamel matrix had begun to form on the molar (red) and dentin matrix (green) had begun to form on the underlying incisor (indicated by arrows). Trichrome staining (C,D) showed a greater width of enamel (brown) and dentin (green) (indicated by arrows) in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mice (D) as compared to wt mice (C). Correlated to this increase in the matrix secretion, von Kossa staining showed increased mineralization in the enamel and dentin matrices (indicated by arrows) of *Pmp<sup>0/0</sup>* (F,H) compared to wt mice (E,G). Bars: B = 500µm, D = 100µm, F = 500µm, H = 200µm, and apply to panels A, C, E and G respectively. Secretory ameloblast (SAB), secretory odontoblast (SOB), bone (Bo) and dental pulp (P).

**Fig. 4 (Right).** Immunohistochemical staining of type I collagen (Col I), decorin (DCN) and osteopontin (OPN) in newborn wt (A,C,E) and *Pmp<sup>0/0</sup>* (B,D,F) molars. Staining of *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse molars showed increased type I collagen immunolabeling in odontoblasts and dentin matrix (B) (indicated by arrows) compared to wt molars (A). The predentin (PD) stained positive for decorin (C,D) (indicated by arrows), with decreased immunostaining in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse molars (D). Anti-osteopontin antibody was localized in the dentin matrix (indicated by arrows), and was increased in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse molar (E) compared to wt molar (F). Bar in B = 100µm and applies to all panels. Secretory odontoblast (SOB), dental pulp (P), predentin (PD) and dentin matrix (DM).





**Fig. 5.** Microhardness of enamel, dentin and predentin in adult mouse molars, determined by microindentation. Although there was no significant difference in enamel hardness (A), the dentin (B) and predentin (C) of *Pmp<sup>ko</sup>* mice had a significantly decreased hardness compared to wt mice (\* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ; Student's *t*-test).

in the secretory ameloblasts. There was no signal for PrP<sup>C</sup> in the *Pmp<sup>ko</sup>* mouse (Fig. 1G).

**Dental mesenchymal cells isolated from E18 *Pmp<sup>ko</sup>* mouse molars had increased proliferation rate, leading to more rapid mineral formation in vitro**

Analysis by BrdU immunoassay showed that embryonic dental mesenchymal cells derived from E18 *Pmp<sup>ko</sup>* mouse molars had enhanced proliferative activity compared to age-matched wt control cells ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 2A). When the cells were grown

in mineralization media for 2 wks, the more rapidly proliferating cells isolated from *Pmp<sup>ko</sup>* mice, differentiated sooner and formed more mineralizing nodules as indicated by increased von Kossa staining (Fig. 2B).

**Early initiation of odontoblast and ameloblast cell differentiation and matrix apposition were detected in newborn *Pmp<sup>ko</sup>* mouse teeth**

Cross-sections of mouse mandibles, taken at the same distance from the incisal tips, showed earlier initiation of dentin and enamel formation in *Pmp<sup>ko</sup>* mice compared to the wt mice (Fig. 3 A,B). Sections slightly more incisally located, at a later stage of matrix secretion, showed that the *Pmp<sup>ko</sup>* mice had a relatively thicker enamel matrix (Fig. 3 C,D), and a more mineralized dentin matrix compared to wt mice (Fig. 3 E-H). These results were confirmed on three independent samples of *Pmp<sup>ko</sup>* and wt mice.

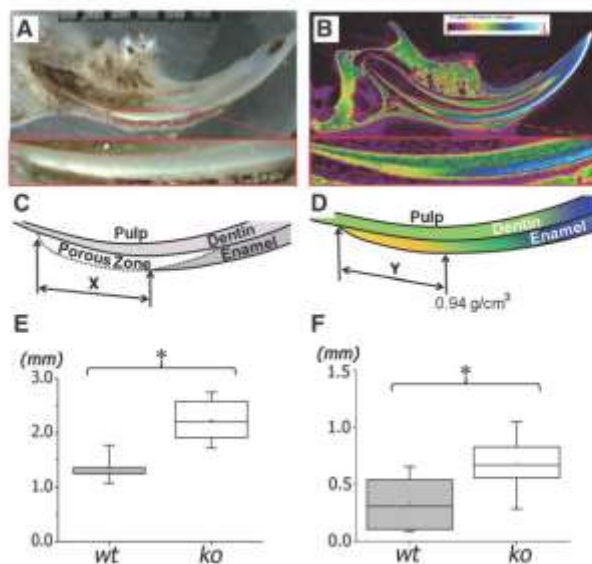
Type I collagen immunostaining signal was increased in the *Pmp<sup>ko</sup>* newborn mouse odontoblasts and dentin matrix (Fig. 4 A,B). Immunostaining signals for decorin in predentin were reduced in the *Pmp<sup>ko</sup>* mouse teeth compared to wt (Fig. 4 C,D), whereas osteopontin was increased in the *Pmp<sup>ko</sup>* mouse dentin matrix (Fig. 4 E,F). These results were confirmed in three sets of independent samples. qPCR analysis on laser microdissected pre-odontoblasts and secretory odontoblasts also showed enhanced differentiation of *Pmp<sup>ko</sup>* odontoblasts with a 27 fold reduction in PCNA, a 1.4 fold increase in type I collagen expression, and a 2.1 fold increase in DSPP as compared to wt secretory odontoblasts (Table 1).

**Dentin of adult *Pmp<sup>ko</sup>* mouse molars had reduced hardness**

Microhardness of enamel from sagittally sections of adult mouse molars was not significantly different between *Pmp<sup>ko</sup>* and wt mice ( $n = 6$ ) (Fig. 5A). However, the microhardness of both dentin and predentin was significantly lower in *Pmp<sup>ko</sup>* mouse molars compared to wt mouse molars ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 5B,C).

**Enamel mineralization in *Pmp<sup>ko</sup>* mouse incisors was delayed**

A stereoscopic analysis of ground sagittal sections showed a significantly increased length of the more porous zone in the continuously erupting *Pmp<sup>ko</sup>* mouse incisors ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 6E). This zone represents the partially mineralized matrix at the transition stage between the protein-rich secretory stage of enamel and the mineralized maturation stage of enamel. A microCT analysis also showed a significant increase in the length



**Fig. 6.** Sagittal sections of mandibular incisors showed an increased length of early mineralizing zones in enamel of *Pmp<sup>ko</sup>* (ko) mice by both stereomicroscopy (A,C,E), and microCT (B,D,F). (A) Representative stereomicroscopic image showed the white opaque zone, which occurs when the secretory matrix proteins are removed, leaving an increased porosity zone prior to final mineralization. (B) A representative microCT image taken at the center of a sagittal view of a hemimandible. Length of the porous zone "X" shown schematically in (C) was significantly increased in the ko incisors as compared to wt incisors (E). Similarly, length of the zone "Y" from the first detectable mineralizing matrix to the point with a relative density 0.94 g/cm<sup>3</sup> of a developing incisor (D) was significantly increased in the ko incisors compared to wt mice (F) (\* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ; Student's *t*-test).

TABLE 1

FOLD DIFFERENCE OF mRNA EXPRESSION  
IN PRE-ODONTOBLASTS (POB) AND SECRETORY  
ODONTOBLASTS (SOB) MICRODISSECTED  
FROM *Pmp<sup>0/0</sup>* (ko) AND wt NEWBORN MOUSE INCISORS

Fold Difference	PCNA	Type I collagen	DSPP
POB (ko/lt)	0.88 ± 0.07	1.85 ± 0.02	4.17 ± 0.02
SOB (ko/lt)	0.037 ± 0.17	1.41 ± 0.03	2.13 ± 0.02

Data are the averages of two independent samples, each measured in triplicate. The standard deviation (indicated by ±) for all 6 measurements is included as an indication of reproducibility.

of the early mineralizing (secretory stage) enamel in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse incisor compared to the wt controls ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 6F). This analysis was further confirmed by a cross-sectional imaging analysis of the forming mouse incisor enamel (data not shown).

## Discussion

PrP is primarily expressed in the CNS, though modest expression can also be detected in the peripheral nervous system and non-neuronal tissues (Caughey *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2001; Manson *et al.*, 1992). Although much is known about the pathologic isoform of PrP, termed PrP<sup>Sc</sup>, the physiological role of normal cellular PrP<sup>C</sup> remains poorly defined (Aguzzi *et al.*, 2008; Chiesa and Harris 2009). The generation of mouse lines devoid of PrP (*Pmp<sup>0/0</sup>*) demonstrated that PrP is essential for prion propagation (Bueler *et al.*, 1993; Manson *et al.*, 1994b; Prusiner *et al.*, 1993). There were no gross abnormalities initially observed in *Pmp<sup>0/0</sup>* mice, however subsequently, subtle and in some cases disputed phenotypic deficits were reported (Collinge *et al.*, 1994; Uedo *et al.*, 1996). Recent suggestions for PrP<sup>C</sup> function include roles in olfaction (Le Pichon *et al.*, 2009), membrane transport (Fuhrmann *et al.*, 2006), maintenance of peripheral myelin (Bremer *et al.*), and regulating self-renewal and differentiation status of stem cells (Lee and Baskakov 2010).

Our observations reported in this study are consistent with the previous findings that PrP<sup>C</sup> is localized in human and mouse odontoblasts (Manson *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2007), as well as secretory ameloblasts in the developing tooth organ (Khan *et al.*, 2010). However, our immunolocalization analysis showed PrP<sup>C</sup> highly localized in the apical border as well as lateral cell membranes, particularly in secretory odontoblasts and ameloblasts. This location may suggest a potential role of PrP related to cross-membrane transport or signaling transmission.

The tooth organ is a unique system containing neural crest derived mesenchyme and ectoderm derived epithelia that differentiate through reciprocal signaling interactions to form the mineralized dentin and enamel tissues. Dentin, formed by the mesenchymally derived odontoblasts is a collagenous mineralized tissue with many of the similar characteristics as bone. Enamel is the only mineralized epithelial-derived tissue in the human body, and is initially formed as a protein matrix. Enamel matrix proteins immediately attract minerals to initiate mineralization. Enamel proteins are then removed through the actions of proteinases and the overlying ameloblasts, which commit apoptosis as teeth erupt. A hard acellular mineral enamel structure is formed to protect dentin and pulp complex. As described in this study, we used the tooth organ to identify the effects of PrP<sup>C</sup> on epithelial and mesenchymally

derived mineralized tissues throughout their differentiation and mineralization.

We used both molars and incisors to investigate the roles of PrP<sup>C</sup> on the different tissues at various stages of tooth formation. Embryonic stage dental mesenchymal cells were compared *in vitro* for proliferation and differentiation. Dentin formation and mineralization was examined in the unerupted newborn mouse molar, and the fully formed dentin was characterized in erupted mouse molars. Enamel formation was characterized using the continuously erupting incisor where all stages of enamel formation can be identified within a single tooth.

We found stage-specific effects of PrP<sup>C</sup> on tooth organ development. In the dental mesenchyme, when the undifferentiated dental mesenchymal cells lacking PrP were grown *in vitro*, the cells were highly proliferative compared to the age-matched wt mouse dental mesenchymal cells. When these cells were cultured in a mineralizing media, they formed more mineralizing nodules. This increased nodule formation by *Pmp<sup>0/0</sup>* embryonic dental mesenchymal cells is likely to be related to their increased proliferation rate, leading to earlier confluence and cell differentiation *in vitro*.

This observation that rapid dividing dental mesenchymal cells leading to earlier cell differentiation also was evidenced by our observation from the effects of PrP<sup>C</sup> on early dentin, as well as enamel differentiation and matrix maturation in animal model. In newborn mouse molars and incisors lacking of PrP resulted in earlier dentin and enamel matrix formation. This earlier formation of the dentin matrix was also evidenced by increased immunostaining for type I collagen and osteopontin, both of which are related to dentin matrix formation and mineralization. Similarly a reduction of decorin in the predentin layer is correlated with dentin maturation (Waddington *et al.*, 2003). qPCR analysis of mRNA isolated from odontoblasts (terminal differentiated dental mesenchymal cells) microdissected by LCM from cryosectioned newborn mouse incisors, showed increased expression of collagen type I, DSPP and reduced PCNA, also consistent with enhanced odontoblast differentiation. Final dentin formation in the *Pmp<sup>0/0</sup>* mice had a reduced microhardness as compared to wt mice, even though dentin mineralization was initiated earlier in tooth formation.

Although there was also earlier mineralization of secretory stage enamel in *Pmp<sup>0/0</sup>* mice, the length of the secretory and transition stages of the *Pmp<sup>0/0</sup>* mouse enamel formation was longer, with the end result being no difference in final enamel density. This finding that there was no effect of PrP on final enamel mineralization was confirmed by the lack of any change in microhardness of molar enamel.

The varying effects of PrP at different stages of mineralizing tooth tissue formation, point to a common mechanism, potentially related to the altered intracellular calcium regulation. In bone marrow stromal cells, PCNA expression declines when the intracellular calcium concentration is increased (Ichikawa and Gamba 2009). The similarities between bone marrow stromal cells and dental mesenchymal cells in gene regulation and fate determination (Menicanin *et al.*), suggest that the increased proliferation rate of undifferentiated *Pmp<sup>0/0</sup>* dental mesenchymal cells may also relate to PrP modulation of intracellular calcium (Beraldo *et al.*, Kagenishi *et al.*, 2009).

Although the role of calcium in the initiation of tooth tissue cell differentiation is not well defined, the location of PrP at the apical border of both secretory ameloblasts and odontoblasts is consis-

tent with the hypothesis that this protein is related to  $\text{Ca}^{2+}$  transport (Fuhmann et al., 2006), or regulating  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Powell et al., 2008).

An interesting application of these studies is the potential to manipulate PrP expression in dental mesenchymal cells, to enhance proliferation in sites of injury. In pulp injury secondary to dental caries or trauma, the dental pulp mesenchymal stem cells must proliferate, and migrate to the area of injury for repairing. Therefore, blocking PrP expression could potentially promote more rapid cell proliferation and pulp healing, including the formation of secondary dentin. The cellular mechanism of PrP regulation of tooth organogenesis and repair will require further studies of the unique processes that promote stage-specific differentiation as the tooth develops.

## Materials and Methods

### Tissue samples

All human tissues were collected under the approval of the University of California San Francisco (UCSF) committee on human research. Developing human tooth organs were obtained from fetal cadaver tissues, obtained through the tissue-sharing program within UCSF.

Wild-type FVB mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). PrP knockout mice (*Prnp*<sup>0/0</sup>) have been previously described (Bueler et al., 1992), and were on the FVB genetic background. Adult mice were euthanized by  $\text{CO}_2$  asphyxiation, followed by decapitation, and newborn mice were euthanized by decapitation.

### Immunohistochemical localization of PrP in the developing human and mouse incisors

Maxillas containing tooth organs from 21–24 week-old human fetal tissues, and heads from newborn wt and *Prnp*<sup>0/0</sup> mice, were collected and stored in 20% sucrose solution for 24 hr. The tissues were embedded and frozen in OCT compound (Tissue-Tek, USA), and cryosectioned at a thickness of 12  $\mu\text{m}$ . The sections were fixed with 95% methanol and 5% acetic acid for 20 min at  $-20^\circ\text{C}$ . Non-specific antibody binding was blocked with 3% bovine serum albumin for 30 min at room temperature, followed by washing in PBS with mild shaking for 5 min, 3 times. Slides were incubated with goat anti-PrP antibody (sc-7693, Santa Cruz Biotechnology INC, CA) for 48 hr at  $4^\circ\text{C}$ , followed 3 washes in PBS. The slides were then incubated with secondary antibody (FITC conjugated anti-goat IgG) for 1 h in the dark at room temperature, washed, and counterstained with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33324 (Invitrogen, CA) for 5 min. Slides were mounted, observed, and photographed with Nikon Eclipse E800 fluorescent microscope.

### The effect of PrP on undifferentiated dental mesenchymal cells in vitro

Pregnant mice were euthanized by standard carbon dioxide asphyxiation at the 18th day of gestation and the mandibular molar tooth buds were microdissected from the embryos under a dissecting microscope (Nikon SMZ 1500) in cold Hank's buffer. The tooth tissues were digested with 2 mg/ml collagenase/dispase for 2 hr at  $37^\circ\text{C}$ , followed by further digestion with STV (0.05% trypsin, 0.025% versene) for 5 min. Pulp dental mesenchymal cells (DMCs) were selectively grown in DMEM H-16 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, CA) and 1% penicillin-streptomycin at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .

To analyze the role of PrP on pulp cell proliferation, DMCs from wt and *Prnp*<sup>0/0</sup> mice were plated at 5,000 cells/well in a 96-well plate and grown in DMEM, 10% FBS, 1% PS at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  for 2 days. The cells were then synchronized in serum free DMEM for 24 hr and the media was then replaced with DMEM, 10% FBS and 1% PS, 10  $\mu\text{L}$  BrdU and incubated for 24 hr. BrdU incorporation was compared using a BrdU chemiluminescence assay (Roche Applied Science, IN), according to the manufacturer's instructions.

To determine the effect of PrP on cell differentiation in vitro, DMCs from

E18 *Prnp*<sup>0/0</sup> and wt mice were grown in mineralization media including DMEM, 10% FBS, 1% PS, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 nM dexamethasone, and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid for 2 wks. Von Kossa staining was used to identify mineral formation by first washing the cells with PBS, then fixing them in 2% glutaraldehyde for 15 min, washing, and then incubating the cells in 5%  $\text{AgNO}_3$  solution for 30 min in the dark. The staining was revealed by ultraviolet exposure for 1 hr.

### Characterization of dentin and enamel matrix formation in *Prnp*<sup>0/0</sup> and wt teeth

Mandibles of newborn mice were dissected out under a stereo-microscope, fixed in 10% neutral-buffered formalin overnight, rinsed with PBS, and dehydrated in a series of graded alcohols. The mandibles were then embedded in paraffin, and serially cross-sectioned at 7  $\mu\text{m}$  thickness. Some sections were stained with Masson's trichrome (Hebling et al., 1999), with adjacent sections analyzed following von Kossa staining or immunolocalization of type I collagen, decorin or osteopontin.

For von Kossa staining, sections were dewaxed and incubated in 5% silver nitrate for 20 min. After washing with distilled water three times, the sections were incubated in 5% sodium thiosulfate for 2 min, followed by washing in distilled water and then dehydrated in a gradient series of alcohols.

Type I collagen was immunolocalized by first incubating the sections with 1 mg/ml hyaluronidase for 48 hr, rinsing with Walpole's buffer (sodium acetate 1.17% w/v, brought to pH 4.5 with glacial acetic acid) followed by PBS, and then incubating with rabbit type I collagen antibody (Chemicon International, CA) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The sections were then rinsed 3 times, incubated 1.5 hr with the peroxidase conjugated secondary anti-rabbit antibody (Dako, Denmark), and visualized with diaminobenzidine substrate (DAB, Sigma, MO).

Decorin, a small leucine-rich proteoglycan (SLRPs) noncollagenous protein, was immunodetected after pretreatment of the sections with chondroitinase ABC (Sigma, 0.25 U/mL Tris/NaCl, pH 8) for 20 min at  $37^\circ\text{C}$ , to activate antigenic sites. After rinsing with PBS, the sections were incubated with rabbit anti-decorin antibody (LF113, generous gifts from Larry Fisher, NIDCR) and detected by DAB as described above. Osteopontin was detected after incubation with anti-OPN antibody (LF123, generous gift from Larry Fisher, NIDCR).

### Analyses of gene expression in odontoblasts isolated by microdissection

Laser capture microdissection (LCM) was done using a PALM Microlaser system® (Leica). Newborn mouse mandibles (wt and ko) were fresh frozen, embedded in OCT, and cryosectioned at  $-18^\circ\text{C}$  with a thickness of 12  $\mu\text{m}$ . The sections were mounted on polyethylene naphthalate (PEN) foil glass slides (Leica) with 8 sections per slide. After H&E staining, the slides were air-dried, and pre-odontoblasts (POB) and secretory odontoblasts (SOB) were separately dissected and catapulted to microtube caps designed for the PALM system. The caps with the collected cells were placed on microtubes containing 50  $\mu\text{L}$  lysis buffer stock solution (49.3  $\mu\text{L}$  RLT buffer + 0.5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -ME + 0.2  $\mu\text{L}$  Linear acrylamide), and briefly vortexed upside down. RNA purification was done with RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, CA), and reverse transcription was done with Super Script III (Invitrogen, CA), following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR (qPCR) was done using an Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems Inc., CA) with specific primers to amplify PCNA, type I collagen, and dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA.

### Microhardness of molar enamel and dentin

Mandibles from 2-month old male mice were embedded in epoxy resin and sagittally ground to the mid-section of the first molars. A flat and highly polished surface was generated using graded series of polishing grit in order to establish orthogonality with the indenter tip (Ho et al., 2004). Microindentation was performed on enamel, dentin (coronally and apically), and predentin (around the pulp chamber and root canal space) under dry conditions using a Knoop diamond indenter (Buehler Ltd., Lake

Bluff, IL) and a normal load of 10 gram force. Each indent was identified using a light microscope and the long diagonal measured using Image-Pro data-acquisition software (Image-Pro Plus Microscope, version 4.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Microhardness was determined by:  $HK = 0.014229P/D^2$  where HK is the Knoop microhardness in gigapascal (GPa), P is the normal load in Newtons (N) and D is the length of long diagonal in millimetres (mm).

#### Stereomicroscopic and microCT analyses of enamel mineralization

Mandibles from two-month-old adult male mice were separated into 2 hemimandibles. The left hemimandible from each mouse was embedded in epoxy resin and ground sagittally to the central plane of the incisor using 600 grit silicon carbide paper, photographed under a stereomicroscope, and compared. Enamel formation was characterized by the length of the white opaque enamel zone at the lingual surface of incisors, ending when the more mineralized enamel took on a more translucent color.

Right dry hemimandibles were scanned with a microCT (micro x-ray computed tomography unit: SkyScan 1076B, Belgium) to characterize the mineral density of the dental tissues in wt and *Prnp<sup>0/0</sup>* mice. Scans were done at 100 kVp, 100  $\mu$ A with a resolution of 8.67  $\mu$ m. 2D sections were stored in a bmp format with indexed gray levels ranging from 0 (black) to 255 (white). DataViewer software (ver 1.4.1 SkyScan) was used to locate a midsagittal plane, which was then used for densitometry (g/cm<sup>3</sup>) analysis. A cross-sectional plane was taken through the incisor perpendicular to the mesial root of the first molar, and the density of the enamel in the wt and *Prnp<sup>0/0</sup>* mice was compared.

#### Acknowledgements

We wish to thank Mr. Bruno Passet (UMR de Genetique Animale et de Biologie Integrative, INRA, France) for providing mice for histological studies, and Mr. Dominique Le Denmat (EA 2496, University Paris Descartes, France) for his assistance in photographing histological sections. This study was supported by NIDCR grants R21-DE017910 to Pamela Den Besten.

#### References

- AGUIZZI A, BAUMANN F, BREMER J (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-477.
- BEI M, MAAS R (1998). FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125: 4325-4333.
- BERALDO FH, ARANTES CP, SANTOS TG, QUEIROZ NG, YOUNG K, RYLETT RJ et al. (2010). Role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. *J Biol Chem* 285: 36542-36550.
- BREMER J, BAUMANN F, TIBERI C, WESSIG C, FISCHER H, SCHWARZ P et al. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13: 310-318.
- BUJER H, FISCHER M, LANG Y, BLUETHMANN H, LIPP HP, DEARMOND SJ et al. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- BUJER H, AGUIZZI A, SAILER A, GREINER RA, AUTENRIED P, AGUET M et al. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347.
- CAUGHEY B, RACE RE, CHESBRO B (1988). Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J Gen Virol* 69 (Pt 3): 711-716.
- CHIESA R, HARRIS DA (2009). Fishing for prion protein function. *PLoS Biol* 7: e75.
- COLLINGE J, WHITTINGTON MA, SIDLE KC, SMITH CJ, PALMER MS, CLARKE AR et al. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297.
- FUHRMANN M, BITTNER T, MITTEREGGER G, HAIDER N, MOOSMANG S, KRETZSCHMAR H et al. (2006). Loss of the cellular prion protein affects the  $Ca^{2+}$  homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* 98: 1876-1885.
- HARADAH, KETTUNEN P, JUNG HS, MUSTONEN T, WANG YA, THESLEFF I (1999). Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 147: 105-120.
- HEBLING J, GIRO EM, COSTA CA (1999). Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 27: 557-564.
- HO SP, BALOOCH M, MARSHALL SJ, MARSHALL GW (2004). Local properties of a functionally graded interphase between cementum and dentin. *J Biomed Mater Res A* 70: 480-489.
- ICHIKAWA J, GEMBA H (2009). Cell density-dependent changes in intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization via the P2Y2 receptor in rat bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 219: 372-381.
- KAGENISHI T, YOKAWA K, KUSE M, ISORE M, BOU/TEAU F, KAWANO T (2009). Prevention of copper-induced calcium influx and cell death by prion-derived peptide in suspension-cultured tobacco cells. *Z Naturforsch C* 64: 411-417.
- KHAN QE, PRESS CM, SEHIC A, LANDIN MA, RISNES S, OSMUNDSEN H (2010). Expression of prion gene and presence of prion protein during development of mouse molar tooth germ. *Eur J Oral Sci* 118: 558-565.
- LAZARINI F, DESLYS JP, DORMONT D (1991). Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 10: 343-346.
- LE PICHON CE, VALLEY MT, POLYMENIDOU M, CHESLER AT, SAGDULLAEV BT, AGUIZZI A et al. (2009). Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* 12: 60-69.
- LEE YJ, BASKAKOV IV (2010). Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *J Neurochem* 114: 362-373.
- LI R, LIU D, ZANUSSO G, LIU T, FAYEN JD, HUANG JH et al. (2001). The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* 207: 49-58.
- LLEDO PM, TREMBLAY P, DEARMOND SJ, PRUSINER SB, NICOLL RA (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2403-2407.
- MANDLER M, NEUBUSER A (2001). FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Dev Biol* 240: 548-559.
- MANSON J, WEST JD, THOMSON V, MCBRIDE P, KAUFMAN MH, HOPE J (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115: 117-122.
- MANSON JC, CLARKE AR, HODGER ML, AITCHISON L, MCCONNELL I, HOPE J (1994a). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8: 121-127.
- MANSON JC, CLARKE AR, MCBRIDE PA, MCCONNELL I, HOPE J (1994b). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* 3: 331-340.
- MCKINLEY MP, HAY B, LINGAPPA VR, LIEBERBURG I, PRUSINER SB (1987). Developmental expression of prion protein gene in brain. *Dev Biol* 121: 105-110.
- MENICANIN D, BARTOLD PM, ZANNETTINO AC, GRONTHOS S (2010). Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues. *Stem Cells Dev* 19: 1501-1510.
- NEUBUSER A, PETERS H, BALLING R, MARTIN GR (1997). Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90: 247-255.
- OKADA H, SAKURAI M, YOKOYAMA T, MOHRI S (2010). Disease-Associated Prion Protein in the Dental Tissue of Mice Infected with Scrapie. *J Comp Pathol*.
- POWELLAD, TOESCU EC, COLLINGE J, JEFFERYS JG (2008). Alterations in  $Ca^{2+}$  buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons. *J Neurosci* 28: 3877-3886.
- PREMZL M, GAMULIN V (2007). Comparative genomic analysis of prion genes. *BMC Genomics* 8: 1.
- PRUSINER SB, GROTH D, SERBAN A, KOEHLER R, FOSTER D, TORCHIA M et al. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10608-10612.
- SCHNEIDER K, KOROMAZ Y, ADDICKS K, LANG H, RAAB WH (2007). Prion protein (PrP) in human teeth: an unprecedented pointer to PrP's function. *J Endod* 33: 110-113.
- SHARPE PT (2001). Neural crest and tooth morphogenesis. *Adv Dent Res* 15: 4-7.
- THESLEFF I, NIEMINEN P (1996). Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 8: 844-850.

- TREMBLAY F, BOUZAMONDO-BERNSTEIN E, HEINRICH C, PRUSINER SB, DEARMOND SJ (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* 1139: 60-67.
- VAAHTOKARI A, ABERG T, THESLEFF I (1996). Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122: 121-129.
- WADINGTON RJ, HALL RC, EMBERY G, LLOYD DM (2003). Changing profiles of proteoglycans in the transition of predentine to dentine. *Matrix Biol* 22: 153-161.

## **XI. Annexe II**



## Pulp Cell Tracking by Radionuclide Imaging for Dental Tissue Engineering

Jean-Baptiste Souron, DDS,<sup>1,2</sup> Anne Petiet, PhD,<sup>3</sup> Franck Decup, DDS, PhD,<sup>1,2</sup> Xuan Vinh Tran, DDS, PhD,<sup>1,4</sup> Julie Lesieur, PhD,<sup>1</sup> Anne Poliard, PhD,<sup>1</sup> Dominique Le Guludec, MD, PhD,<sup>5</sup> Didier Letourneur, PhD,<sup>6</sup> Catherine Chaussain, DDS,<sup>1,2</sup> Francois Rouzet, MD, PhD,<sup>5,6,\*</sup> and Sibylle Opsahl Vital, DDS, PhD<sup>1,2,\*</sup>

Pulp engineering with dental mesenchymal stem cells is a promising therapy for injured teeth. An important point is to determine the fate of implanted cells in the pulp over time and particularly during the early phase following implantation. Indeed, the potential engraftment of the implanted cells in other organs has to be assessed, in particular, to evaluate the risk of inducing ectopic mineralization. In this study, our aim was to follow by nuclear imaging the radiolabeled pulp cells after implantation in the rat emptied pulp chamber. For that purpose, indium-111-oxine (<sup>111</sup>In-oxine)-labeled rat pulp cells were added to polymerizing type I collagen hydrogel to obtain a pulp equivalent. This scaffold was implanted in the emptied pulp chamber space in the upper first rat molar. Labeled cells were then tracked during 3 weeks by helical single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography performed on a dual modality dedicated small animal camera. Negative controls were performed using lysed radiolabeled cells obtained in a hypotonic solution. *In vitro* data indicated that <sup>111</sup>In-oxine labeling did not affect cell viability and proliferation. *In vivo* experiments allowed a noninvasive longitudinal follow-up of implanted living cells for at least 3 weeks and indicated that SPECT signal intensity was related to implanted cell integrity. Notably, there was no detectable systemic release of implanted cells from the tooth. In addition, histological analysis of the samples showed mitotically active fibroblastic cells as well as neoangiogenesis and nervous fibers in pulp equivalents seeded with entire cells, whereas pulp equivalents prepared from lysed cells were devoid of cell colonization. In conclusion, our study demonstrates that efficient labeling of pulp cells can be achieved and, for the first time, that these cells can be followed up after implantation in the tooth by nuclear imaging. Furthermore, it appears that grafted cells retained the label and are viable to follow the repair process. This technique is expected to be of major interest for monitoring implanted cells in innovative therapies for injured teeth.

### Introduction

TEETH ARE PARTICULARLY prone to severe injury because of their location and function. They can be affected by dental caries, a progressive degradation of dental tissues by the by-products of cariogenic bacteria contained in the oral biofilm. If not treated promptly, this process results in pulp infection rapidly spreading in the periapical area. Healthy teeth can also be severely damaged by fracture as a result of trauma. The most common treatment of both conditions, endodontic treatment, consists of pulp removal, mechanical

enlargement of the root canal, and placement of a bioinert material sealed with root canal cement in the cleaned pulp cavity. However, endodontically treated teeth are also prone to both fracture due to dryness and absence of sensitivity, and periapical infections resulting from inadvertently left pulp remnants, which are good substrata for bacterial growth. Such infections may further disseminate and induce systemic complications, such as infective endocarditis, nephropathies, or rheumatic fever.<sup>1,2</sup>

The evidence of cells endowed with stem cell properties in adult pulp, the dental pulp stem cells (DPSCs), promoted the

<sup>1</sup>EA2496, Dental School, University Paris Descartes PRES Sorbonne Paris Cité, Montrouge, France.

<sup>2</sup>AP-HP Services Odontologie HUPNVS and Charles Foix, Paris, France.

<sup>3</sup>Institut Claude Bernard—ICB 2, UFR de Médecine, site Bichat, Paris, France.

<sup>4</sup>Faculty of Odonto-Stomatology, University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City, Vietnam.

<sup>5</sup>Department of Nuclear Medicine, Bichat-Claude Bernard Hospital, AP-HP, Paris, University Paris Diderot-Paris 7, France.

<sup>6</sup>Inserm, U698, Cardiovascular Bioengineering and University Paris Diderot-Paris 7, Paris, France.

\*Both authors contributed equally to this work.

research on the development of alternative therapeutic approaches.<sup>3-5</sup> Among them, several teams have proposed a therapy of the pulpal lesions through tissue engineering using these stem cells.<sup>6-10</sup> Indeed, DPSCs are capable of differentiating into dentin-forming cells after ectopic implantation,<sup>11</sup> in tooth slice models<sup>12-15</sup> and in response to pulp aggression in a canine pulp injury model.<sup>10</sup>

*In situ* partial pulp regeneration by using tissue engineering is based on the observation that pulpal infection and inflammation are compartmentalized until the entire pulp tissue undergoes necrosis.<sup>4,9,16</sup> Current evidence suggests that the remaining healthy portion of the pulp could be recoverable before the final stages and may have the potential to regenerate the lost portion under certain conditions.<sup>9</sup> To enhance this regeneration, engineered pulp constructs by growing pulp cells onto collagen or synthetic scaffolds may be inserted into the pulp space to facilitate the total recovery of pulp tissue.<sup>9</sup>

Although the proof of concept of pulp therapy with stem cells is now obtained, transfer to human teeth requires deciphering cellular and molecular mechanisms underlying tissue repair. An important point is to determine the fate of implanted cells over time and, particularly, during the early period following implantation. Indeed, the success of tissue engineering is known to be dependent on an initial homing of implanted cells and subsequent engraftment to the target tissue. To this regard, *in vivo* imaging has been reported as a tool used to track the initial homing.<sup>17,18</sup> In addition, the potential engraftment of the implanted cells in other organs has to be assessed to evaluate the risk of inducing ectopic mineralization or tumorigenicity.<sup>19,20</sup>

In the specific perspective of pulp engineering, the follow-up of implanted cells is hampered by the fact that pulp is embedded in highly calcified tissues, especially the enamel that prevents the use of classical cell labeling techniques, such as fluorescence<sup>21</sup> or bioluminescence.<sup>22</sup> Nuclear imaging (either single-photon emission computed tomography [SPECT] or positron emission tomography) is an alternative approach that is likely to overcome such a constraint. Indeed, this highly sensitive imaging method is particularly suited for cell tracking since it is based on the detection of photons in the gamma range, which are only faintly attenuated by mineralized tissues.<sup>23</sup> Cell labeling with indium-111-oxine (<sup>111</sup>In-oxine) is a well-established method validated in pre-clinical and clinical studies<sup>24-26</sup> and routinely used in humans in the setting of infection scintigraphy since the 1970s.<sup>27,28</sup> Indium forms a neutral and lipid-soluble complex with three molecules of 8-hydroxyquinoline (oxine), which enables it to penetrate through the phospholipid bilayer cell membrane. Within the cell, the indium becomes firmly attached to cytoplasmic components (such as lactoferrin). Once labeled, cells may be tracked by monophotonic scintigraphy (SPECT) during the days or weeks after implantation due to physical half-life ( $T_{1/2}$  = 2.83 days) of <sup>111</sup>In.

In the context of developing a cell therapy for damaged dental tissues, we have specifically focused in the present study, on the fate of radiolabeled pulp cells after implantation in a rat emptied pulp chamber. We were able to follow-up the implanted <sup>111</sup>In-oxine-labeled pulp cells during 3 weeks postimplantation. In parallel, we assessed the repair process occurring during this period by microcomputed tomography (micro-CT) and histology.

## Materials and Methods

### Animals

All experiments in this study were designed according to the ARRIVE guidelines and were performed under a protocol approved by the Animal Care Committee of the University Paris Descartes. No. CEEA34.CC.010.11.

### Cell isolation and culture

Multicolony-derived rat pulp cells were obtained using a protocol adapted from Gronthos *et al.*<sup>11</sup> from the molars of 5-day Lewis rats. Under sterile conditions, rat molars were extracted using a scalpel blade and artery forceps, and the dental pulp tissue was then removed with a sterile barbed broach. The tissue was evenly sliced into 1–2-mm sections, and then incubated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 3 mg/mL collagenase type I (Worthington Biochem) and 4 mg/mL dispase (Boehringer) in a shaking water bath (at 37°C) for 1 h.

The isolated cells were then centrifuged (100 g) at 4°C for 5 min, washed in PBS, resuspended, and plated in the DMEM (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 100 mg/mL streptomycin at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

The cultures were visually monitored regularly using the light microscopy. The required cell number (10<sup>6</sup>/experiment) for the *in vivo* experiments was reached after 3–4 passages.

### Radiolabeling of rat pulp cells with <sup>111</sup>In-oxine

Dental pulp cells were detached under mild conditions in 0.05% trypsin, 0.02% EDTA (Sigma-Aldrich) for 5 min at 37°C, and then centrifuged at 100 g for 5 min. The cell pellet was resuspended in the serum- and glucose-free DMEM, and the cell concentration was measured by microscopic examination.

Labeling was carried out by mixing 25 × 10<sup>6</sup> pulp cells with 50 MBq <sup>111</sup>In-oxine and a 1 mL TRIS buffer (Coviden Pharmaceuticals). After incubation at 37°C for 30 min, the labeled cells were separated from <sup>111</sup>In-oxine solution excess by centrifugation. Subsequently, cells were washed twice with the serum-free DMEM. To determine the radiolabeling efficiency, radioactivity of labeled cell pellets and supernatants was measured in an activity meter (Medi 404; Medisystem). <sup>111</sup>In-oxine-labeling efficiency, expressed as a ratio of cell suspension activity to total activity (supernatants and pellet activities), was ~30%. *In vitro* stability of radiolabeling was evaluated 2 h after labeling; only 5% of the total activity was eluted from labeled cells. To assess the role of cell membrane integrity in retention of <sup>111</sup>In-oxine in pulp equivalents, lysed cells were also prepared. Cell lysis was obtained by a 5-min contact between radiolabeled cells and the hypotonic solution (distilled water).

### Cell proliferation assay and cell viability testing

Radiolabeled cells and unirradiated cells were cultured in the DMEM (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Labeled and unlabeled pulp cell proliferation and viability were performed at 0, 1, and 5 days after labeling, respectively, using the hemocytometer and Trypan blue test.



#### Pulp equivalent preparation

Type I collagen was extracted from rat-tail tendons in acetic acid solutions to constitute a stock solution at 2 mg/mL and stored at 4°C, according to.<sup>29</sup> Briefly, to prepare four pulp equivalents, 0.04 mL of a concentrated Eagle's minimum essential medium, 0.2 mL of a type I collagen solution, 0.04 mL 0.1 N NaOH, and 0.119 mL of either the entire or lysed radiolabeled cells corresponding to  $2.4 \times 10^6$  cells ( $6 \times 10^3$  cells/matrix) were added and mixed at 0°C. The final concentration of collagen was 1 mg/mL. This mixture was poured into a culture plate for bacteriological culture to prevent cell adhesion at the bottom of the well, with DMEM, 1% penicillin-streptomycin serum free and incubated 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for complete collagen polymerization. The pulp equivalent preparation can be kept up to 4 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> before implantation.

#### Rat pulpotomy model

Twenty 2-month-old male inbred Lewis rats weighing between 160 and 220 g were used for all experiments. Rats were housed in pairs and fed standard rat chow and water *ad libitum* (Supplementary Video S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/tec](http://www.liebertpub.com/tec)).

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a combination of ketamine 10% (Imalgene 500; Merial) and xylazine 2% (Rompun; Bayer). On the maxillary first molars, an occlusal cavity was drilled to the pulp chamber with high-speed rotary 0.6-mm-diameter round bur (Maillefer Dentsply) under an endodontic microscope (Carl Zeiss). The cameral pulp parenchyma was eliminated with a rotary instrument. Hemostasis was obtained by sterile cotton pellet compression. One pulp equivalent (100 µL) was placed within each empty pulp chamber space. Each animal received both treatments (entire cells and lysed cells) on the left and right first maxillary molars. The occlusal cavity was sealed with a calcium silicate-based restorative cement (Biodentine™; Septodont) and covered with a light-cured composite (FloRestore; Denmat). Animals were then allowed to recover.

For histological analysis, animals were sacrificed by intracardiac perfusion with a 4% paraformaldehyde/glutaraldehyde solution buffered with sodium cacodylate 0.1 M at pH 7.2–7.4, at days 14 and 28 after the surgery.

#### SPECT/CT imaging procedure

A first scan was performed immediately after implantation of pulp equivalent, and then every 7 days until the signal was no longer detectable (equal to background signal). Each scan included the first acquisition centered on the craniofacial area, designed to quantify the activity related to implanted pulp equivalent in teeth, as well as potential signals in lymph nodes secondary to clearance of radiolabeled cell debris. A second whole-body acquisition was intended to detect a potential signal in the reticuloendothelial system secondary to systemic diffusion of cells or cell debris.

#### Acquisition and reconstruction parameters

Helical SPECT/CT was performed on a dual modality dedicated small animal camera (NanoSPECT/CT plus; Bioscan, Inc.) under intraperitoneal pentobarbital anesthesia (40 mg/kg b.w.; Ceva Santé Animale). SPECT used a multi-

plexed multipinhole technology (four detectors equipped with nine 0.9-mm-diameter pinhole tungsten collimators each, allowing a spatial resolution of 0.8 mm). Acquisitions centered on the craniofacial area were performed using the fine mode (helical scan with 28 projections/rotation plus circular scans at the beginning and at the end of the scan range, 50 s/projection). Whole-body acquisitions were performed using a standard mode (helical scan with 28 projections/rotation, 30 s/projection). All datasets were reconstructed using dedicated HiSPECT software (Bioscan, Inc.) with an iterative algorithm (three subsets and three iterations), pixel size: 0.5 mm.

Flat-panel detector CT was performed with the following parameters: helical acquisition with 240 projections/rotation, zoom: 1.3, pitch: 1, time/step: 1000 ms, tube voltage: 55 kV, tube current: 145 mAs, and reconstructed using filtered backprojection algorithm with a Ram-Lak (ramp) filter, in-plane voxel size of  $147 \times 147$  µm, and slice thickness of 147 µm.

#### Data analysis

Reconstructed SPECT and CT scans were coregistered using InVivo Scope software (Bioscan, Inc.), allowing to localize areas of increased activity. The presence of signals within the pulp chamber on visual analysis was quoted, as well as the presence of uptake in ectopic foci if present. To assess the amount of cells implanted within the pulp chamber, as well as its evolution over time, we quantified the <sup>111</sup>In-oxine activity by drawing three-dimensional regions of interest (ROI) on CT, corresponding with treated teeth. ROI were then automatically applied on SPECT images and provided activities (total count value), which were then corrected from radioactive decay. This correction is due to physical half-life of the radionuclide and allows for comparison of sequential measurements by normalization of activities. For decay correction, the following formula was applied:  $A_0 = A_t (e^{\lambda t})$ , where  $A_0$  represents the total count value at the time of pulp equivalent implantation ( $t = 0$ );  $A_t$  represents the total count value at the time of measurement ( $t > 0$ );  $e$  is the exponential function;  $\lambda$  is the radioactive constant ( $\ln 2$ /physical half-life of the radionuclide expressed in days), which is approximated to (0.693/2.83) for <sup>111</sup>In; and  $t$  is the time elapsed since pulp implantation expressed in days.

#### Micro-X-ray CT analysis

For exploration of the repair process at 2 weeks, 1 month postsurgery, maxillary blocks were fixed in 4% paraformaldehyde and stored in 70% ethanol at 4°C. Half maxillas were subjected to a desktop micro-CT (Skyscan 1172; Skyscan). Scanning time was ~20 min. Samples were reconstructed using NRecon software (Skyscan) and visualized using OsiriX imaging software (3.7.1 version).

#### Histology and immunohistochemistry

Blocks, including the maxillary molar, were decalcified in 4.13% EDTA for ~3 months. After tissue embedding in Paraplast, serial sections (7 µm) were stained for hematoxylin and eosin. For immunohistochemical analysis, the sections were incubated with primary antibodies against proliferating cell nuclear antigens (Calbiochem) diluted at 1/100, against von Willebrand factor (ABCAM ab-6994) diluted at 1/200, and against the anti-calcitonin gene related peptide (CGRP)

(Sigma-Aldrich C819) at 1/2000. Tissue sections were then incubated with anti-mouse immunoglobulin (Dakocytomation) diluted at 1/100. Color reaction was developed by using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride. A negative control was included by using an equal concentration of rabbit preimmune serum as the primary antibody.

#### Statistical analysis

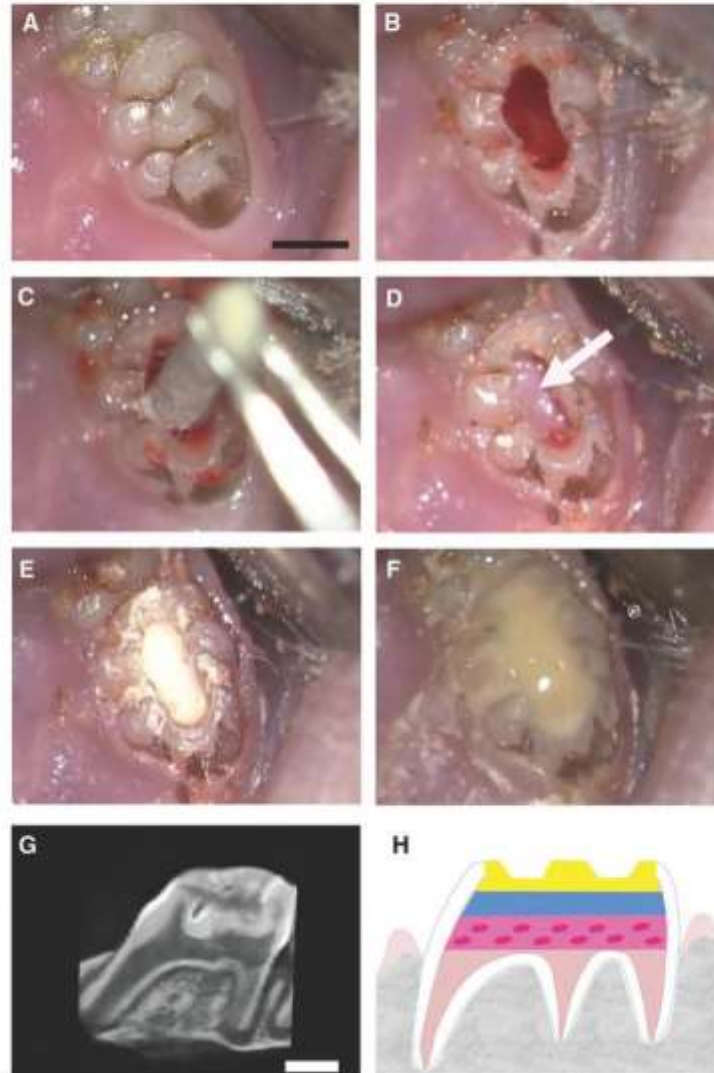
Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between two groups were performed using the

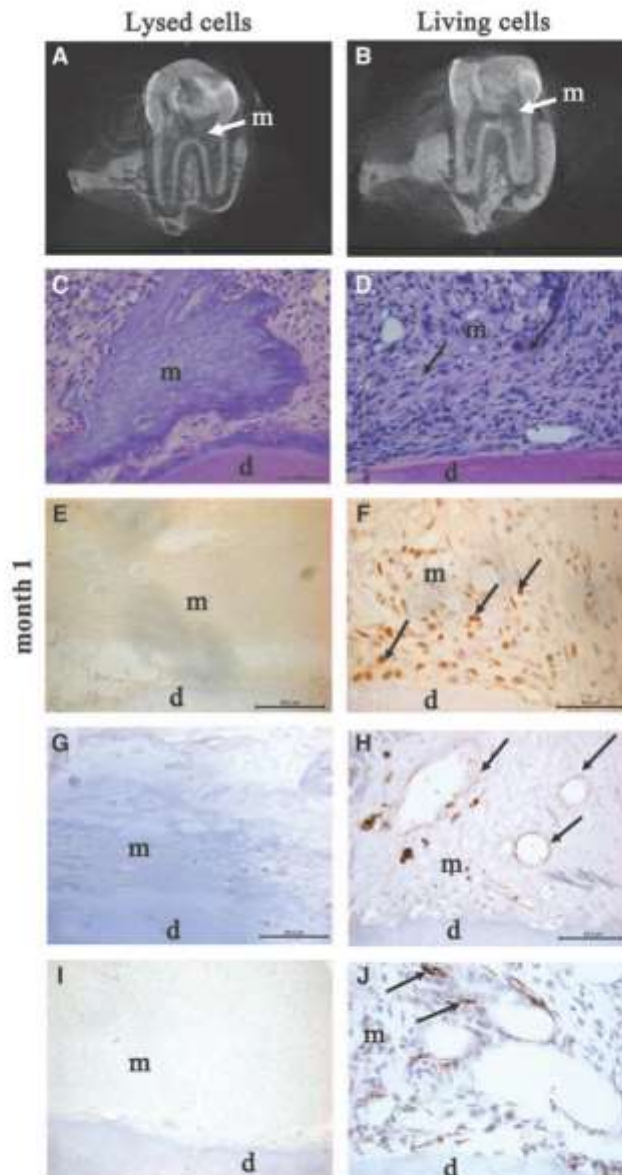
Mann-Whitney *U* test and between more than two groups using the Kruskal-Wallis test. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

#### Results

To evaluate pulp therapy with mesenchymal stem cells for injured teeth, we used a rat pulpotomy model consisting of removing the cameral pulp parenchyma. A pulp equivalent with rat pulp cells seeded in a 3D collagen matrix is then placed in the emptied pulp space (Fig. 1).

**FIG. 1.** Description of the rat pulpotomy model. The pulpotomy model based on the implantation of pulp equivalent (pulp cells seeded in a 3D collagen hydrogel) in the rat pulp chamber (scale bar, 1 mm). After anesthesia, drilling of an occlusal cavity of the first upper molar under an endodontic microscope (A). Elimination of the cameral pulp parenchyma with a rotary instrument (B). After hemostasis by compression (C), placement of radioactive pulp equivalent (with either entire cells or lysed cells) in the pulp chamber space (white arrow shows the pulp equivalent) (D). Sealing of the cavity with a calcium silicate-based cement (Biodentine™; Septodont) (E). Covering with light-cured flow composite (FloRestore; Denmat) (F). Microcomputed tomography (micro-CT) imaging of the tooth immediately after implantation showing the different layers (G), which are illustrated on a schema (dotted-pink layer: pulp equivalent seeded with cells; blue layer: calcium silicate-based cement; yellow layer: composite restoration) (H). Color images available online at [www.liebertpub.com/tec](http://www.liebertpub.com/tec)



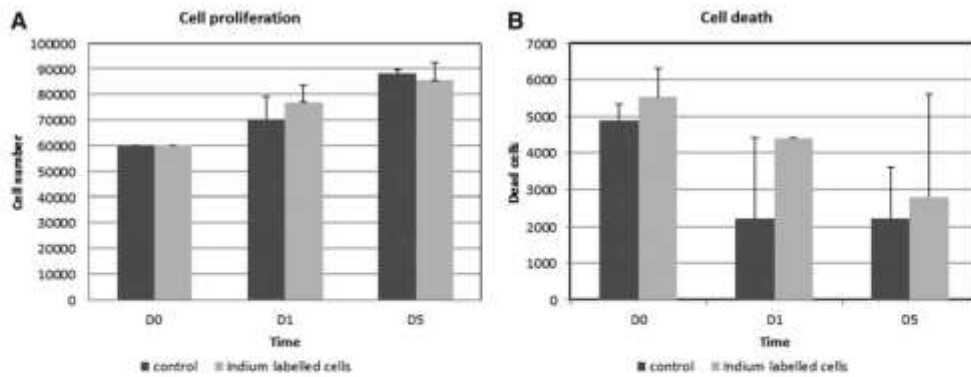


**FIG. 2.** Repair process at 1-month postpulp cell implantation. Micro-CT imaging showed no pulp or root canal obliteration 4 weeks after implantation of lysed cells (A) or living cells (B) (white arrows show the implanted matrix). At month 1, hematoxylin and eosin staining showed the absence of cells in the collagen matrix implanted with lysed cells (C). In contrast, numerous cells were observed in the matrix (arrows) implanted with living cells (D). Immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen showed proliferating cells (arrows) in the matrix seeded with living cells (F), but not in controls (E). Vascularization (arrows) was observed by immunostaining for von Willebrand factor in the matrix seeded with living cells (H), whereas no vessel was observed in controls (G). Innervation was evidenced in the matrix seeded with living cells by immunostaining for the calcitonin gene related peptide, which labels sensory nervous fibers (arrows) (J). In contrast, no labeling was observed in the control matrix (I). d, dentin; m, implanted matrix.

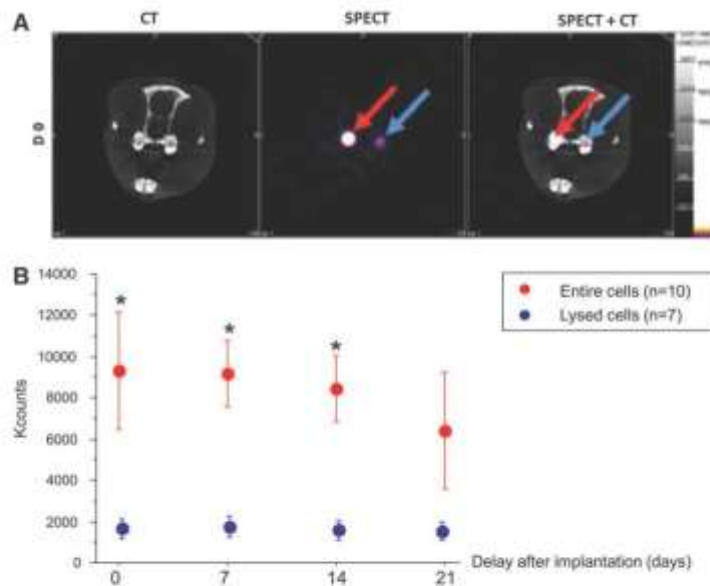
#### Analysis of repair process

We analyzed the repair process at 1 month following pulp cell implantation (Fig. 2). Micro-CT imaging showed no pulp or root canal obliteration by mineral apposition in both the treatment groups. Histological analysis showed numerous

fibroblasts into the collagen matrix implanted with living cells. Among these cells, several were immunolabeled for PCNA, an antibody used to identify mitotically active cells (Fig. 2F). In contrast, no cell was observed in the matrix implanted with lysed cells, either by histology or by immunolabeling for PCNA (Fig. 2C, E).



**FIG. 3.** Effect of indium-111-oxine ( $^{111}\text{In}$ -oxine) labeling on pulp cell proliferation and viability. The absence of detrimental effect of  $^{111}\text{In}$ -oxine incorporation on the proliferation rate of labeled cells at early time points (0, 1, and 5 days). Mean results of three individual experiments are presented with 95% confidence intervals for cultures of  $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled cells and controls. There was no significant difference between the groups (A). The absence of detrimental effect of  $^{111}\text{In}$ -oxine incorporation on the viability of labeled cells at same time points (no significant difference) (B).



**FIG. 4.** *In vivo* follow-up of implanted pulp equivalents by single-photon emission computed tomography (SPECT)—comparison of entire and lysed cells.  $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled cells, entire (red arrow) and lysed (blue arrow), were followed up after implantation with SPECT/CT. The signal displays a greater intensity in tooth implanted with living cells when compared to samples implanted with lysed cells (A). Quantification of  $^{111}\text{In}$ -oxine activity was performed during 3 weeks. Data are presented as mean  $\pm$  SEM after radioactive decay correction. Although a similar  $^{111}\text{In}$  activity was embedded in both pulp equivalents, detected counts are 5-fold lower in the preparation with lysed cells in all time points, including immediately postimplantation. This suggests a release of cell fragments from the collagen network during implantation. There is no significant count decrease according to time in both pulp equivalents (Kruskal–Wallis  $p = 0.6$  for entire cells and  $p = 1$  for lysed cells) (B). \* $p < 0.004$  (Mann–Whitney) between entire and lysed cells.



Vascularization structures were observed in contact with the implanted matrix seeded with living cells. As expected, these structures were immunolabeled for von Willebrand factor (Fig. 2H) and alpha smooth muscle actin (data not shown). In addition, we investigated for a potential neurogenesis in the implanted matrix and clearly observed the structures immunolabeled for CGRP, which attests the presence of sensory nerve fibers in the matrix seeded with living cells (Fig. 2I). In contrast, neither vessel nor nervous fiber was observed in the implanted matrix seeded with lysed cells (Fig. 2G, I).

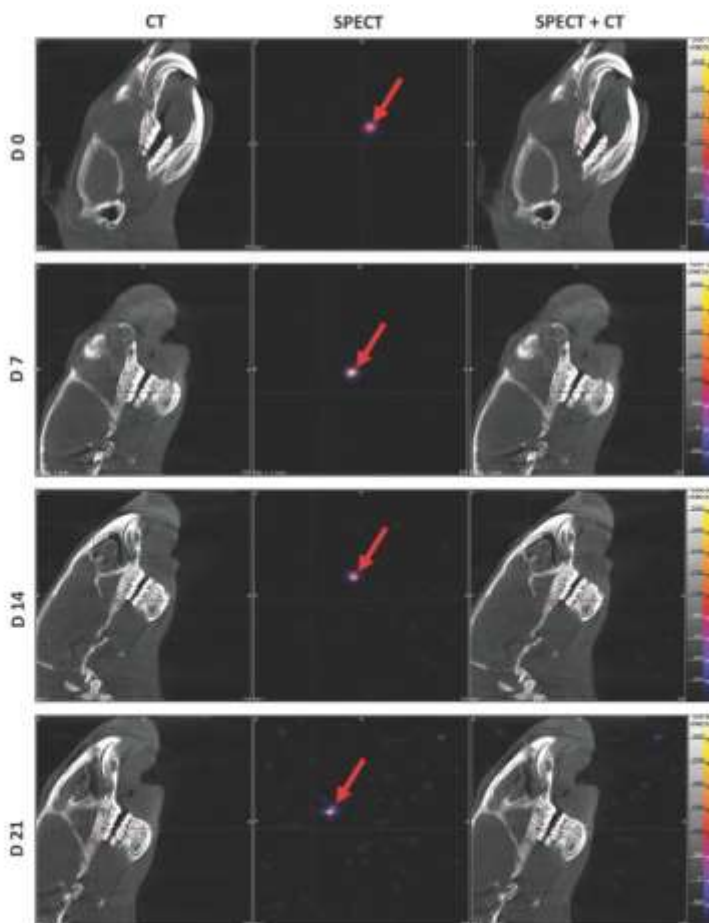
#### Viability of radiolabeled cells

To assess a possible effect of the  $^{111}\text{In}$ -oxine radiolabeling process on rat pulp cells, we compared proliferation and viability of labeled and unlabeled pulp cells. Radiolysis phenomena are likely to affect cell viability. As shown in

Figure 3A, the proliferation rate of labeled cells was comparable to that of unlabeled cells at day 1 and 5. Furthermore, at the same time points, both labeled and unlabeled pulp cells exhibited a similar viability rate, which was  $>90\%$  (Fig. 3B).

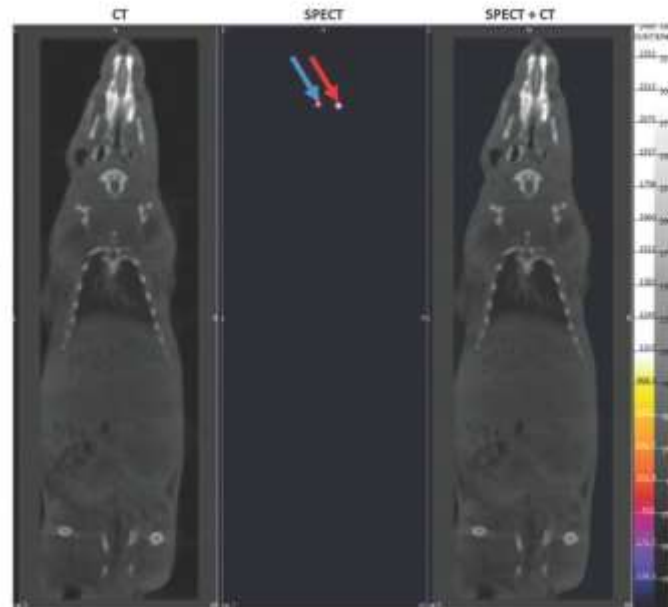
#### SPECT/CT imaging of $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled DPSCs in pulpotomy models in vivo

The *in vivo* follow-up of  $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled cells was performed using SPECT and CT scans, allowing a comparison between living and lysed cells (Fig. 4A). A signal was detectable in teeth implanted with pulp equivalent for at least 3 weeks after implantation, without a significant decrease (corrected from radioactive decay), according to time whatever pulp cells embedded were entire or lysed. However, total counts were 5-fold higher in pulp equivalents prepared with entire cells compared with lysed cells,



**FIG. 5.** Craniofacial imaging. SPECT/CT imaging of  $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled cell implantation. Implanted living cells were successfully tracked during 3 weeks (red arrows). Localization of implanted cells was possible with merging SPECT and CT images (right column). No signal was detectable out of the teeth and, in particular, no cell spreading was observed in the craniofacial area.

**FIG. 6.** Whole-body imaging. Whole-body imaging at D14 did not show spreading of labeled cells, either in the ectopic sites or in the reticuloendothelial system. red arrow: living cells; blue arrow: lysed cells.



although pulp equivalents embedded the same  $^{111}\text{In}$ -oxine activity at baseline before implantation. This result indicates a correlation between the cellular integrity and the strength of the signal. This difference of detected signal intensity remained steady from the day of implantation ( $9334 \pm 2867$  vs.  $1764 \pm 528$  counts,  $p < 0.004$ ) to the end of the experiment (Fig. 4B).

To determine whether implanted cells remained localized in the pulp chamber or underwent dissemination, we analyzed both the craniofacial area (lymph nodes) (Fig. 5) and whole-body acquisitions (reticuloendothelial system) (Fig. 6) by SPECT/CT. No signal was detected outside the tooth, whatever the delay after implantation, suggesting that radiolabeled cells remained located in the pulp chamber.

## Discussion

The fate of implanted cells is crucial in tissue engineering and, to the best of our knowledge, this issue has never been investigated in the dental pulp context. In this study, we tracked  $^{111}\text{In}$ -oxine-labeled rat pulp cells implanted in the rat upper first molar by SPECT. Our data showed that (1) 1 month after implantation, living and mitotically active fibroblasts as well as new vessels and nervous fibers were present in the pulp equivalents seeded with entire cells, whereas pulp equivalents prepared from lysed cells were devoid of cell colonization; (2) *in vivo* SPECT signal intensity was related to implanted cell integrity and allowed a noninvasive longitudinal follow-up for at least 3 weeks; and (3) there was no detectable systemic release of implanted cells from the pulp chamber.

Cell labeling with radioisotope such as  $^{111}\text{In}$  followed by SPECT detection is a well-established method for monitoring

implanted cells in several models, including acute brain trauma and cerebral or myocardial ischemia.<sup>25,30</sup> For the specific engraftment in the dental pulp, nuclear imaging and MRI<sup>31</sup> were the two possible noninvasive imaging methods. However, these techniques had to be tailored for the exploration of highly calcified dental tissues, especially the enamel (96% of mineral). In particular, for MRI, specific radio frequency fields have to be developed.

In this study, we used nuclear imaging, which offers a high sensitivity together with the possibility of signal quantification, both determinants for cell tracking during the first weeks after implantation (for review, see Ref.<sup>30</sup>). In addition, nuclear imaging provides information on whole-body bio-distribution of labeled cells. This permits to check that there was no accumulation of cell debris in organs involved in blood clearance: the kidneys, liver, and spleen, as well as lungs in case of venous diffusion. Furthermore, whole-body imaging allows the detection of a possible dissemination of implanted cells, which, in the case of DPSCs, could lead to ectopic mineralization, an important safety issue in tissue engineering. Therefore, our study provides reliable results for the first 3 weeks following implantation, which is a decisive period in terms of biological events (cell engraftment, proliferation, potential migration, angiogenesis, etc.). In the future, the use of MRI, a technique allowing a longer follow-up of implanted cells, may provide complementary information regarding the fate of implanted cells in the dental pulp.

The present study showed that the radiolabeling process did not alter both the viability and proliferation ability of pulp cells *in vitro*. Additionally, histological analysis evidenced the presence of cells in the collagen matrix seeded

with entire cells 1 month after implantation, conversely to those seeded with lysed cells. Finally, implanted pulp equivalents displayed signal intensity much intense when seeded with entire cells. Taken together, those results suggest that the *in vivo* SPECT signal was related to the viability of implanted cells and thus could be a useful surrogate marker to monitor pulp equivalent engraftment. Indeed, evidences of cell colonization, neovascularization, and neurogenesis of the collagen matrix seeded with entire cells, conversely to those seeded with lysed cells, support the critical role of cell viability in promoting engraftment of pulp equivalent. The ability offered by SPECT to assess viability of the implant in living animals is expected to be of major interest in a challenging environment (alterations of physicochemical conditions), which is clinically relevant. In the present study, cells were implanted in healthy teeth, whereas in dental clinic, cells will be implanted in damaged and inflamed teeth. This underlies the limit of our animal model and requires further investigations under less favorable conditions. However, for the first time, our study shows that it is possible to track cells in the dental tooth and paves the way for future investigations.

SPECT/CT results revealed complete retention of radioactivity in the implanted teeth over the observation time period, and no evidence of redistribution to other organs. Conversely, pulp equivalents prepared from lysed cells were associated with a drop in signals originating from the time of implantation, suggesting a lack of cell debris retention by the collagen matrix. Indeed, even if the signal is not directly related to cell viability, a decrease in intensity is likely to account for the elimination of cell residues; in the event of cell death, the radiotracer would be eliminated *via* the kidneys and the bile duct.<sup>32,33</sup> In this respect, the marked difference in signal intensity between pulp equivalents containing entire cells and lysed cells is observed at the time of implantation. Although labeling is equivalent in both cases, membrane rupture leads to the loss of <sup>111</sup>In-oxine retention, and the radioactivity was released in the culture plate and cotton pellets used.

Cell proliferation in the matrix was detected at 1 month following implantation of intact cells in contrast with the controls. This suggests that our implanted cells remained viable in the pulp equivalent. However, we cannot exclude the possibility that these cells are recruited host-derived cells since both are from the same species. Further studies using human cells in immunodeficient rats or FISH analysis with male/female donors/receivers may allow to distinguish implanted cells from host cells.

The pulpotomy model consists of eliminating cameral pulp parenchyma, yet maintaining vascular pedicle to allow neoangiogenesis (colonization of pulp substitute by neovessels) from dental roots. Our analysis showed that indeed neoangiogenesis is occurring, but only in implanted tissues seeded with living cells. Angiogenesis plays a key role in tissue production since without the existence of a functional vascular network, cells have to rely on diffusion for nutrient supply and waste removal.<sup>9</sup> A rapid vascularization of the implanted tissue is therefore a major issue in the success of the pulp therapy. Noteworthy, we were able to detect sensory nervous fibers in the implanted matrix, which attest the functionality of our reconstructed tissue.<sup>34,35</sup> Interestingly, we did not detect a mineralization of the pulp chamber that

might be expected through the implantation of cells that have been shown to easily undergo an odonto/osteogenic differentiation process.<sup>36</sup> This confirms that the use of a low-osteogenic carrier, such as the loose type 1 collagen matrix, is adapted to engineer the dental pulp.<sup>37</sup> The formation of tertiary dentin at the boundary of the scaffold with the dentin walls remains to be investigated at longer time points.

In conclusion, our study demonstrates that pulp cell labeling using <sup>111</sup>In-oxine is feasible and allows for their noninvasive follow-up during the first weeks after implantation. Signal intensity detected by SPECT is related to cell integrity and further seems to be related to pulp equivalent engraftment. This technique is expected to be of major interest in monitoring DPSCs used in cell therapy for the damaged tooth.

#### Acknowledgments

This work was supported by the University Paris Descartes and the University Paris Diderot, by Assistance Publique - Hôpitaux de Paris and by grants from Fondation de l'Avenir (ET1-610) for Sibylle Opsahl Vital (EA2496) and François Rouzet (Inserm U698) and Fondation Les Gueules cassées for EA2496. The authors thank Mrs Annie Llorens for her assistance with immunohistochemistry for nervous fibers and Mr Cyril Willig (present address: Université Pierre et Marie Curie, Plateforme d'histologie, Bâtiment Jussieu, Paris, France) for his participation to the surgeries and Dr. Anne Gruaz-Guyon (U773, UFR de Médecine, site Bichat) for her assistance equipment.

#### Disclosure Statement

The authors have no conflict of interests.

#### References

- Parahitiyawa, N.B., Jin, L.J., Leung, W.K., Yam, W.C., and Samaranayake, L.P. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev* 22, 46, Table of Contents, 2009.
- Somma, F., Castagnola, R., Bollino, D., and Marigo, L. Oral inflammatory process and general health. Part 2: how does the periapical inflammatory process compromise general health? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15, 35, 2011.
- Sun, H.H., Jin, T., Yu, Q., and Chen, F.M. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 5, e1, 2011.
- Huang, A.H., Chen, Y.K., Chan, A.W., Shieh, T.Y., and Lin, L.M. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod* 35, 673, 2009.
- Rosa, V., Della Bona, A., Cavalcanti, B.N., and Nor, J.E. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater* 28, 341, 2012.
- Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakasima, A., and Akamine, A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 83, 590, 2004.
- Cordeiro, M.M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 34, 962, 2008.
- Prescott, R.S., Alsanee, R., Fayad, M.L., Johnson, B.R., Wenckus, C.S., Hao, J., et al. *In vivo* generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen

- scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* **34**, 421, 2008.
9. Huang, G.T. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med* **4**, 697, 2009.
  10. Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Ishizaka, R., Nakamura, H., Ito, T., et al. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med* **4**, 377, 2009.
  11. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625, 2000.
  12. Cavalcanti, B.N., Zeitlin, B.D., and Nor, J.E. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater* **29**, 97, 2012.
  13. Suzuki, T., Lee, C.H., Chen, M., Zhao, W., Fu, S.Y., Qi, J.J., et al. Induced migration of dental pulp stem cells for *in vivo* pulp regeneration. *J Dent Res* **90**, 1013, 2011.
  14. Galler, K.M., Cavender, A.C., Koekue, U., Suggs, L.J., Schmalz, G., and D'Souza, R.N. Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel. *Regen Med* **6**, 191, 2011.
  15. Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A., Shi, S., et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* **89**, 791, 2010.
  16. Huang, A.H., Snyder, B.R., Cheng, P.H., and Chan, A.W. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* **26**, 2654, 2008.
  17. Berman, S.C., Galpothawela, C., Gilad, A.A., Bulte, J.W., and Walczak, P. Long-term MR cell tracking of neural stem cells grafted in immunocompetent versus immunodeficient mice reveals distinct differences in contrast between live and dead cells. *Magn Reson Med* **65**, 564, 2011.
  18. Manley, N.C., and Steinberg, G.K. Tracking stem cells for cellular therapy in stroke. *Curr Pharm Des* **18**, 3685, 2012.
  19. Gu, E., Chen, W.Y., Gu, J., Burrige, P., and Wu, J.C. Molecular imaging of stem cells: tracking survival, biodistribution, tumorigenicity, and immunogenicity. *Theranostics* **2**, 335, 2012.
  20. Lindvall, O., and Kokaia, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation? *J Clin Invest* **120**, 29, 2010.
  21. Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* **90**, 1103, 2010.
  22. de Almeida, P.E., van Rappard, J.R., and Wu, J.C. *In vivo* bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H663, 2011.
  23. Sinusas, A.J., Bengel, F., Nahrendorf, M., Epstein, F.H., Wu, J.C., Villanueva, F.S., et al. Multimodality cardiovascular molecular imaging, part I. *Circ Cardiovasc Imaging* **1**, 244, 2008.
  24. Aicher, A., Brenner, W., Zuhayra, M., Badorf, C., Massoudi, S., Assmus, B., et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* **107**, 2134, 2003.
  25. Schachinger, V., Aicher, A., Dobert, N., Rover, R., Diener, J., Fichtlscherer, S., et al. Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium. *Circulation* **118**, 1425, 2008.
  26. Gildehaus, F.J., Haasters, F., Drosse, I., Wagner, E., Zach, C., Mutschler, W., et al. Impact of indium-111 oxine labelling on viability of human mesenchymal stem cells *in vitro*, and 3D cell-tracking using SPECT/CT *in vivo*. *Mol Imaging Biol* **13**, 1204, 2011.
  27. Thakur, M.L., Coleman, R.E., and Welch, M.J. Indium-111-labeled leukocytes for the localization of abscesses: preparation, analysis, tissue distribution, and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med* **89**, 217, 1977.
  28. Roca, M., de Vries, E.F., Jamar, F., Israel, O., and Signore, A. Guidelines for the labelling of leucocytes with (111)In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **37**, 835, 2010.
  29. Chaussain Miller, C., Septier, D., Bonnefoix, M., Lecolle, S., Lebreton-Decoster, C., Coulomb, B., et al. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clin Oral Invest* **6**, 39, 2002.
  30. Yoon, J.K., Park, B.N., Shim, W.Y., Shin, J.Y., Lee, G., and Ahn, Y.H. *In vivo* tracking of 111In-labeled bone marrow mesenchymal stem cells in acute brain trauma model. *Nucl Med Biol* **37**, 381, 2010.
  31. Struys, T., Ketkar-Atre, A., Gervois, P., Leten, C., Hilkers, P., Martens, W., et al. Magnetic resonance imaging of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Transplant* 2012 [Epub ahead of print]; <http://dx.doi.org/10.3727/096368912X657774>.
  32. Brenner, W., Aicher, A., Eckey, T., Massoudi, S., Zuhayra, M., Koehl, U., et al. 111In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* **45**, 512, 2004.
  33. Kraitchman, D.L., Tatsumi, M., Gibson, W.D., Ishimori, T., Kedziorek, D., Walczak, P., et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* **112**, 1451, 2005.
  34. Ishizaka, R., Hayashi, Y., Iohara, K., Sugiyama, M., Murakami, M., Yamamoto, T., et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials* **34**, 1888, 2013.
  35. Nakashima, M., Iohara, K., and Sugiyama, M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 435, 2009.
  36. Yu, J., Wang, Y., Deng, Z., Tang, L., Li, Y., Shi, J., et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* **99**, 465, 2007.
  37. Zhang, W., Walboomers, X.F., van Kuppevelt, T.H., Daamen, W.F., Bian, Z., and Jansen, J.A. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* **27**, 5658, 2006.

Address correspondence to:

Sibylle Opsahl Vital, DDS, PhD

EA2496, Pathologies, Imaging and Biotherapies of the Tooth

Dental School

University Paris Descartes PRES Sorbonne Paris Cité

1 rue Maurice Arnaud

92120 Montrouge

France

E-mail: sibylle.vital@parisdescartes.fr

Received: March 1, 2013

Accepted: June 4, 2013

Online Publication Date: August 16, 2013



## Résumé :

La pulpe dentaire est sujette à des lésions sévères faisant suite à une carie dentaire ou à un traumatisme. La thérapeutique conventionnelle préconisée alors est le traitement endodontique, qui consiste en l'exérèse de la totalité de la pulpe dentaire et le comblement de l'espace pulpaire par un matériau inerte. Ce traitement induit une fragilisation de la dent et une plus grande susceptibilité aux infections.

Au cours de ce travail, nous avons mis au point une solution alternative, en proposant le remplacement de la pulpe dentaire lésée par une « pulpe équivalente » constituée de cellules souches mésenchymateuses de la pulpe ensemencées dans une matrice de collagène. Nous avons testé ce substitut pulpaire au travers d'un modèle de pulpotomie de la molaire chez le rat, à savoir l'exérèse de la totalité du parenchyme de la chambre pulpaire et conservation du réseau vasculaire radiculaire, où nous avons implanté des « pulpes équivalentes ». Notre objectif étant notamment de déterminer le devenir des cellules souches pulpaires implantées dans la dent grâce à l'imagerie nucléaire, dans ce contexte de développement d'une thérapie cellulaire. Les cellules ont été marquées à l'<sup>111</sup>Indium-oxine préalablement à leur implantation. Nous avons montré que le marquage n'avait pas d'incidence sur la viabilité et la prolifération des cellules pulpaires. Le suivi du signal s'est fait par tomographie d'émission monophotonique, couplée à un scanner spécifique du petit animal (NanoSPECT/CT, Bioscan), hebdomadairement pendant 3 semaines. Nous avons mis en évidence que l'intensité du signal SPECT était directement liée à l'intégrité des cellules, puisque que les matrices implantées avec des cellules marquées puis lysées par choc isotonique présentaient une diminution rapide de l'intensité du marquage. Grâce à la sensibilité de la méthode d'imagerie choisie, nous avons montré l'absence de diffusion majeure des cellules dans la circulation sanguine à partir du site d'implantation, ce qui pourrait constituer un risque de minéralisation ectopique lié à l'implantation de cellules souches mésenchymateuses.

Par ailleurs, l'étude par histologie des processus de réparation et régénération de la pulpe dans les dents de rat a mis en évidence une prolifération abondante de cellules de type fibroblastique au sein des matrices, ainsi que la présence de nombreux vaisseaux et de nerfs dans la matrice cellularisée et à proximité. Ces résultats, non observés dans les matrices implantées avec des cellules lysées, suggéraient donc une fonctionnalité du tissu reconstruit et suggéraient que les cellules pulpaires implantées favorisaient une néovascularisation rapide de la pulpe équivalente, vraisemblablement en induisant un recrutement de cellules endothéliales à partir du réseau vasculaire radiculaire résiduel.

**Title : Dental pulp regeneration by tissue engineering: making of a "pulp equivalent"**

## Abstract:

The dental pulp is prone to severe injuries following a tooth decay or trauma. Conventional recommended therapy is the endodontic treatment, which consists in the removal of all of the dental pulp and filling of the pulp space with an inert material. This treatment leads to a weakening of the tooth and a greater susceptibility to infection.

In this work, we have developed an alternative solution, proposing the replacement of the injured dental pulp by an "pulp equivalent" consisting of mesenchymal stem cells from the pulp seeded in a collagen matrix. We tested this pulp substitut through a model of the molar pulpotomy in rats, ie. the removal of the entire parenchyma of the pulp chamber and preservation of the root vascular network and implantation of the pulp equivalent. Our aim was to determine the fate of pulp stem cells implanted in the tooth by nuclear imaging in the context of developing a cell therapy. The cells were labeled with <sup>111</sup>Indium - oxine prior to their implantation. We have shown that the labelling had no effect on the viability and proliferation of pulp cells. The signal tracking was done by single photon emission tomography, coupled with a specific small animal scanner ( NanoSPECT / CT, Bioscan ) weekly for 3 weeks. We demonstrated that the intensity of SPECT signal was directly related to the integrity of the cells, since the lysed labeled cells by isotonic shock showed a rapid decrease in the intensity of labeling. Due to the sensitivity of the chosen imaging method, we have shown the absence of major diffusion cells into the bloodstream from the site of implantation, which could result in a risk of ectopic mineralization related to the implementation of mesenchymal stem cells.

Furthermore, the study by histology repair processes and regeneration of the pulp in teeth rat showed abundant proliferation of fibroblast-like cells within the matrix, and the presence of numerous vessels and nerves in matrix cellularized. These results, not observed in the matrices implanted with lysed cells, thus suggesting a feature of the reconstructed tissue and suggested that the pulp cells implanted favored a rapid neovascularization equivalent pulp, presumably by inducing the recruitment of endothelial cells from the residual root vascular network.

## Mots clés (français) :

Pulpe dentaire, ingénierie tissulaire, cellules souches mésenchymateuses, imagerie nucléaire, suivi cellulaire

## Keywords :

Dental pulp, tissue engineering, mesenchymal stem cells, nuclear imaging, cell tracking